

薬物のプロドラッグ化によるマイクロスフィア  
からの放出制御に関する研究



乙第37号

遠 藤 浩 孝

薬物のプロドラッグ化によるマイクロスフィア  
からの放出制御に関する研究

遠 藤 浩 孝

## 目次

総論の部	・・・・・・・・ 1
緒言	・・・・・・・・ 1
第1章    プロドラッグ含有ポリ L-乳酸マイクロスフィア及びポリ 3-ヒドロキシブチレートマイクロスフィアの調製と評価	・・・・・・・・ 5
第1節    プロドラッグ含有ポリ L-乳酸あるいはポリ 3-ヒドロキ シブチレートマイクロスフィアの調製	・・・・・・・・ 6
第2節    プロドラッグ含有マイクロスフィアからの薬物放出性	・・・・・・・・ 9
第3節    プロドラッグ含有マイクロスフィアからの薬物放出に 及ぼす生体内成分の影響	・・・・ 10
第4節 <i>In vivo</i> マウス P388 白血病モデルを用いた抗腫瘍効果 の評価	・・・・ 14
第5節    小括並びに考察	・・・・ 20
第2章    プロドラッグ含有高分子マイクロスフィアからの 薬物放出メカニズムに関する検討	・・・・ 21
第1節    マイクロスフィアからの薬物放出メカニズムの解析に 関する理論	・・・・ 22
第2節    ポリ L-乳酸マイクロスフィアからの薬物放出メカニズム	・・・・ 24
第3節    エチレン-酢酸ビニル共重合体マイクロスフィアからの 薬物放出メカニズム	・・・・ 28
第4節    L-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体マイクロスフィア からのガラス転移温度以上の温度における 薬物放出メカニズム	・・・・ 33
第5節    L-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体マイクロスフィア からの薬物放出の温度依存性	・・・・ 40
第6節    小括並びに考察	・・・・ 42
第3章    プロドラッグ含有リピッドマイクロスフィアの 調製とリンパ系薬物デリバリーに関する検討	・・・・ 44
第1節    プロドラッグ含有リピッドマイクロスフィアの調製	・・・・ 45

第2節	ラットを用いた経口投与による薬物吸収性の評価	・ ・ ・ ・ 4 6
第3節	経口投与によるリンパ系への薬物デリバリーの評価	・ ・ ・ ・ 4 9
第4節	小括並びに考察	・ ・ ・ ・ 5 1
結論		・ ・ ・ ・ 5 3
謝辞		・ ・ ・ ・ 5 6
実験の部		・ ・ ・ ・ 5 7
第1章	実験の部	・ ・ ・ ・ 5 7
第2章	実験の部	・ ・ ・ ・ 6 1
第3章	実験の部	・ ・ ・ ・ 6 4
引用文献		・ ・ ・ ・ 6 9

## 総論の部

### 緒言

近年、医学、薬学の分野において、高機能を有する薬物送達システム(DDS)が精力的に研究、開発されており、その期待は益々高まりつつある。<sup>1, 2)</sup> 理想的な製剤を設計する上で、その有効性、安全性、及び信頼性を保障することが要求されるが、生理活性の強い化合物に関してその目的を達成するためには、薬物の生体内での挙動を厳密に制御することが必要である。従って、DDS 製剤の研究開発における重要なテーマの一つに、薬物を体内の標的部位(病巣)に選択的に作用させる、薬物の標的指向化(ターゲティング)が挙げられる。ターゲティングに関する種々アプローチの中、病巣への集積性や生体内での滞留性を改善することへの期待から、微粒子キャリアを用いた技術に関して多くの検討がなされており、種々薬物で薬効の増強や副作用の軽減等が報告されている。<sup>3-5)</sup> その剤形としては、マイクロスフィア、<sup>6, 7)</sup> ナノスフィア、<sup>8)</sup> リポソーム<sup>9)</sup> 等が従来よりあるが、今日においてもその基礎検討や応用は活発である。<sup>10-14)</sup> 微粒子キャリアに基本的に求められる機能としては、十分量の薬物を安定に含有する、目的の場所に選択的に効率よく集積する、その部位では望ましい速度で薬物を放出する、の3点が挙げられる。さらに、目的とする本来の機能を果たした後、生体内で自然に分解あるいは吸収されるのが望ましいため、生体適合性の高い生体内分解性高分子を用いて調製される。それら高分子として、ポリ乳酸<sup>15, 16)</sup> やポリ乳酸-グリコール酸共重合体<sup>17, 18)</sup> が従来から知られているが、高分子化学、工学の発展とともに、さまざまな物性を有する生体内分解性高分子が次々と開発され、その性状も、結晶性、非晶性、ペースト状、ろう状と多岐にわたり、生体内分解性高分子の選択性が広がりつつある。一方、生体内成分を材料とした微粒子キャリアには、アルブミンマイクロスフィア、<sup>19)</sup> リポソーム、<sup>9, 20)</sup> リン脂質を乳化剤に用いて水相中にダイズ油を乳化させた o/w 型エマルションであるリピッドマイクロスフィア<sup>21)</sup> 等がある。

このような微粒子キャリアを開発する上では、上述のとおり製剤設計の段階で計画した含量を有し、生体内で計画された場所に集積し、計画した速度で薬物を放出させることの3点が重要である。一般に薬物のキャリアーへの取り込み効率は、調製操

作中の微粒子内への薬物保持率によって決まり、調製法や薬物の物理化学的性質に左右される。例えば、水中乾燥法で調製した親油性高分子を素材としたマイクロスフィアに効率よく取り込まれるのは、親油性薬物に限られ、親水性薬物の取り込み効率は低く、リピッドマイクロスフィアにおいては、その油相に含有できるのは、親油性薬物のみである。ゆえに、親水性薬物を効率よく含有させるために、油中乾燥法<sup>2,2)</sup>やw/o/w 型のエマルジョン製剤<sup>2,3, 2,4)</sup>が盛んに検討されている。しかし、利用可能な材料と調製法には限りがあり、より自由な処方設計のためにはさらなる工夫が必要である。ターゲティングに関わる微粒子の集積性において、微粒子の粒子径は重要で、例えば直径 12  $\mu\text{m}$  以上の微粒子を動脈内に注入すると、流域下の臓器で塞栓を起こす。この現象を利用して、各種微粒子キャリアーに抗癌剤を含有させ、肝動脈での塞栓を目的とした肝動注療法への応用が盛んに検討されている。<sup>2,5-2,7)</sup> 一方、粒子径のさらに小さい 200nm 程度の微粒子が、炎症部位や閉塞性血管病変部位に集積することが知られており、既にパルミチン酸デキサメタゾンやプロスタグランジン E<sub>1</sub> を含有したリピッドマイクロスフィアが商品化されている。このように、微粒子キャリアーは、粒子径を変更することでそれぞれの臓器または部位へ集積可能である利点を有しており、最近では、肺を標的とした吸入剤への適用も考えられている。<sup>2,8)</sup> しかし、最も簡便な投与経路である経口からの目的部位へのターゲティングは、消化管という障壁の存在のため、困難とされているのが現状である。高分子マイクロスフィアからの薬物放出制御に関してもまた、高分子と薬物の物性により決定される要因が多く、薬物放出をコントロールする目的で、添加剤の使用、高分子の種類や分子量の変更、あるいは高分子を混合する方法等<sup>2,9-3,1)</sup> が検討されている。生体内分解性高分子を素材として唯一商品化されているマイクロスフィアであるリュープリン®(武田薬品工業)は、酢酸リュープロレリンの 1 カ月間徐放型の埋め込み剤で、長期間の薬物徐放製剤であるがゆえに、その薬物放出は高分子の分解に影響されるため、その開発段階においても、高分子の種類や分子量に関する検討が多くなされている。<sup>3,2)</sup> しかし、低分子量の薬物の長時間の放出制御については、困難な問題が多い。

以上述べたように、3 つの条件を十分満足する微粒子キャリアーの開発には、克服すべき問題は多いが、今後も種々機能を有する素材を用いて、種々薬物を含有させた微粒子キャリアー製剤が活発に開発されていくと考えられる。このような状況下、著者は、薬物と微粒子キャリアー素材のそれぞれの物性と効果の関係について独立に検

討するだけでなく、薬物と微粒子キャリアー素材の両者の物性とそれらを組み合わせる場合に得られる製剤特性の関係を明確にすることが必要であると考えた。そして、その知見に基づいて、微粒子キャリアー素材の選択と薬物の物性の積極的な修飾を行うことが、より優れた微粒子キャリアー製剤を開発する上で必要不可欠と考えた。

本研究では、薬物として、フッ化ピリミジン系抗癌剤の 2'-deoxy-5-fluorouridine (FUdR)と 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR)を主に用いた。FUdR はチミジレートシンターゼ阻害を起こすことによる DNA 合成阻害を作用機序とするため、癌細胞増殖周期の DNA 合成期に特異的に作用することから、低濃度でも癌細胞に長時間接触させることにより効果が増強する時間依存的な作用を有する抗癌剤である。<sup>33, 34)</sup> 一方、5'-DFUR は、FUdR 同様時間依存的な作用を有する 5-fluorouracil (5-FU)のプロドラッグであり、そのままでは効果を有さないが、癌細胞組織で活性の高いピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼにより 5-FU に変換されるターゲティング効果を有するため、従来のフッ化ピリミジン系抗癌剤より安全性が高く、臨床の場でも広く経口的に用いられている。<sup>35)</sup> これら薬物は、化学構造上の類似体であり、いずれもその糖部に水酸基を 2 つ有し、種々長さの直鎖飽和脂肪酸でアシル化することにより広範囲な物理化学的性質を有するジエステルプロドラッグにすることができる。<sup>36)</sup> さらに、それらプロドラッグを微粒子キャリアーに含有させるアプローチは、抗癌剤のターゲティングの点でも、有用かつ重要であると思われる。

本研究においては、上述した微粒子キャリアーが持つべき 3 つの機能に注目し、薬物をプロドラッグ化することにより、薬物の物理化学的性質を変更し、種々物性を示すプロドラッグと素材を用いて、微粒子キャリアーの一つであるマイクロスフィアを調製した。そして、プロドラッグと素材の物性及び調製したマイクロスフィアの製剤特性の関係を明確化し、それら関係を把握して利用することで、より優れたマイクロスフィアの調製が可能であると考えた。まず、第 1 章においては、結晶性生体内分解性高分子であるポリ L-乳酸及びポリ 3-ヒドロキシブチレートを用い調製したマイクロスフィアに FUdR とそのジエステルプロドラッグを含有させ、それら薬物の徐放化と抗腫瘍効果について検討し、その有効性と問題点について考察した。第 2 章においては、結晶性高分子と非晶性高分子から調製したマイクロスフィアの薬物放出メカニズムについて検討し、放出メカニズムから見た理想的な高分子素材について考察した。そして、最後に第 3 章では、微粒子キャリアーによるターゲティングの 1 例とし

て、液状のリピッドマイクロスフィアに 5'-DFUR のジエステルプロドラッグを含有させ、経口からのリンパ系へのデリバリーについて検討し、リピッドマイクロスフィアの新しい可能性について考察した。



## 第1章 プロドラッグ含有ポリ L-乳酸マイクロスフィア及びポリ 3-ヒドロキシブチレートマイクロスフィアの調製と評価<sup>37, 38)</sup>

癌化学療法においては、抗癌剤の効力を高めるのと同時にその副作用を抑えることが重要である。高分子マイクロスフィア(MS)は、抗癌剤のターゲティングと放出制御により副作用の軽減と効果の増強が期待できることから、種々の抗癌剤を含有するMSが検討されている。MSの調製に用いる高分子材料としては、親水性のアルブミンやゼラチン等と親油性のポリ乳酸や乳酸-グリコール酸共重合体等が利用可能であり、後者の親油性高分子は、安全性や長時間の徐放性が期待できる点で有用である。しかし、抗癌剤には、水溶性が高い薬物が多く、親油性の高分子材料を用いて調製したMSの場合、o/w型エマルジョンに乳化して徐々に固形MSを析出させる水中乾燥法により一般に調製されるため、MS内に抗癌剤を効率的に取り込ませることは難しく、また、薬物放出を制御することも困難である。したがって、親油性高分子により調製されるMSに親水性の薬物を含有させるためには、w/o/w型のエマルジョンを用いた水中乾燥法、油中乾燥法、スプレードライ法<sup>39-42)</sup>等の利用が必要となる。MS製剤で唯一商品化されているリュープリン®(武田薬品工業)の場合は、w/o/w型の水中乾燥法を採用しており、内水相中に薬物を封じ込めるために、低温制御下で薬物と増粘剤を水相に含有させたw/o型の1次乳化を行い、そのw/o型エマルジョンを更に水相に分散させる2次乳化を行って、水溶性の酢酸リュープロレリンを親油性の乳酸-グリコール酸共重合体中に封入している。<sup>17)</sup>この方法は、一般の水中乾燥法に比べ、工程数及び温度管理の点で複雑である。親油性の生体内分解性高分子により調製されるMSからの薬物放出制御に関しては、担体に用いた高分子の分子量や種類、薬物の物理化学的性質が影響することが知られているが、比較的分子量が大きい薬物で薬物放出を数週から数ヵ月間持続させる場合は、放出は主に高分子の分解に依存し、比較的分子量の小さい薬物での短期間の放出は、主に薬物の物理化学的性質とMSの構造に依存すると思われる。

抗癌剤として時間依存的作用を有する代謝拮抗薬を用いた場合には、持続放出によって抗癌剤が癌組織中で、低濃度で長時間存在するため、特に高い効果が得られると考えられる。有効性が高く副作用の少ない製剤を調製するためには、十分量の薬物を安定にMS内に含有させ、薬物放出を理想的に制御することが不可欠である。これら

背景から、薬物の物理化学的性質を化学修飾により脂溶性に変更する方法が、親油性高分子を材料とした MS の薬物取り込み効率の改善と薬物放出制御に有効であると考えた。

本章において、MS 調製に用いる高分子には、ポリ L-乳酸(PLA)とポリ 3-ヒドロキシブチレート(PHB) <sup>43-46)</sup> を選択した(Fig. 1, 2). PLA は、既に手術糸や補助骨として使用されており、生体内で分解を受け代謝される生体適合性の高い生体内分解性高分子である. PHB は PLA より炭素鎖が 1 つ長く、より親油性の高分子であるが、PLA 同様、生体適合性の高い生体内分解性高分子であり、比較的分子量の大きい高分子が得られやすく、分解速度は遅い. 両方の高分子とも比較的結晶性の高い高分子である特徴を有している. MS に含有させる薬物には、水溶性の代謝拮抗薬である 2'-deoxy-5-fluorouridine (FUdR) の糖部水酸基を 8 種の飽和脂肪酸でアシル化したプロドラッグを用いた. そして、一般的な水中乾燥法で MS を調製し、それら物理化学的性質、MS 中への薬物取り込み効率、MS からの薬物放出性、及び抗腫瘍効果について検討した。

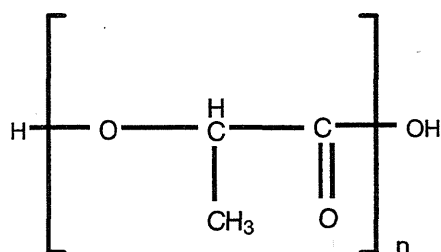


Fig. 1 Structure of Poly (L-Lactic Acid)

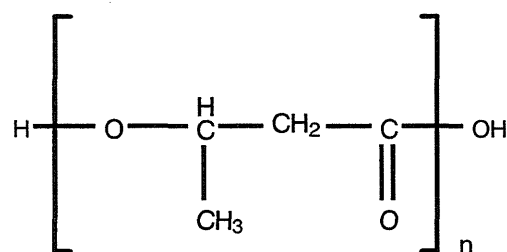


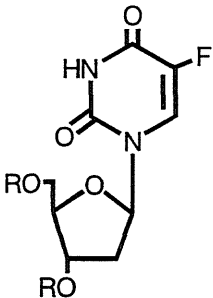
Fig. 2 Structure of Poly (3-Hydroxybutyrate)

## 第1節 プロドラッグ含有 L-ポリ乳酸あるいはポリ 3-ヒドロキシブチレートマイクロスフィアの調製

アシル基の長さが連続的に異なる誘導体を得るために、Nishizawa 等の方法<sup>47)</sup> に従い、FUdR をピリジン中で直鎖飽和脂肪酸の酸無水物と反応させることにより、3',5'-diacyl-FUdR (C<sub>n</sub>-FUdR) : acetyl (n=2) ~ didodecanoyl (n=12) を合成した. FUdR と合成した FUdR プロドラッグの構造を Table 1 に示す.

何れの化合物も NMR で化学構造を確認し、TLC 及び HPLC による分析で、各化合物の純度は 98%以上であることを確認した。また、pH7.0 緩衝液中(37℃)における化学的安定性は既に報告されており、<sup>36)</sup> 本実験を行うのに十分な安定性を示すことを確認した。

Table 1    Structure of 3',5'-Diacyl-FUdR

General structure	-R	Compound name
	-H	FUdR
	-CO-CH <sub>3</sub>	3', 5'-diacetyl-FUdR (C2-FUdR)
	-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-dipropionyl-FUdR (C3-FUdR)
	-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-dibutyryl-FUdR (C4-FUdR)
	-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-dipentanoyl-FUdR (C5-FUdR)
	-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-dihexanoyl-FUdR (C6-FUdR)
	-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-dioctanoyl-FUdR (C8-FUdR)
	-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-didecanoyl-FUdR (C10-FUdR)
	-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CH <sub>3</sub>	3', 5'-didodecanoyl-FUdR (C12-FUdR)

各 FUdR プロドラッグの物理化学的性質と、プロドラッグと分子量 6,000 の PLA を用いて水中乾燥法で調製したマイクロスフィア(PLA-MS)の物理化学的性質を Table 2 に示す。プロドラッグの融点は様々な値を示し、C8-FUdR については 4℃以下であり、oil 状であった。プロドラッグの見かけの分配係数(P)の対数値である logP 値は、アシル基の炭素鎖が長くなるに従って高くなり親油性が増すことが示された。一方、FUdR は、プロドラッグに比べて高い親水性を示した。プロドラッグの水への溶解度は、アシル基が長くなるに従って低くなる傾向にあったが、C3-FUdR の溶解度は C2-FUdR より高く、C5-FUdR もまた C4-FUdR より高い値を示した。C3-FUdR や C5-FUdR の比較的高い溶解度は、それら誘導体の低い融点に関係するものと考えられた。PLA-MS の粒子径に対する FUdR プロドラッグの種類の影響は少なく、何れの平均粒子径も 100 μm 前後の値を示した。

Table 2 より、調製時の薬物と高分子の比(薬物 20mg と高分子 100mg)を等しくした PLA-MS の薬物含有率(薬物/薬物含有 PLA-MS, %)は、プロドラッグのアシル基が長くなるに従って高くなった。薬物取り込み効率(調製時の(薬物/薬物+高分子)に対する薬物含有率の比, %)は、C5-FUdR から C12-FUdR 含有 PLA-MS において、85%

以上と高い値を示した。この理由は、水中乾燥法における o/w 型エマルション形成時に、薬物が主に有機相に分配するためと考えられる。<sup>1,6)</sup> それゆえ、PLA-MS 内への薬物の取り込みは、薬物の親油性に依存しており、親水性薬物は、水中乾燥法における o/w 型エマルション形成時に、ほとんどの薬物が水相に移行してしまうことや水洗の過程における薬物の除去により含有率や薬物取り込み効率の値が低くなると考えられる。

Table 2 Physicochemical Properties of Cn-FUdR and PLA-MS

Compound	m. p. (°C)	Partition coefficient logP <sup>a)</sup>	Solubility in water ( $\mu$ g/ml)	Diameter of PLA-MS ( $\mu$ m) <sup>b)</sup>	Drug content (%) <sup>c)</sup>
FUdR	150	-1.53	>70000	85 $\pm$ 5	0.45 (2.7)
C2-FUdR	152	-0.34	3900	79 $\pm$ 3	0.17 (1.0)
C3-FUdR	77	0.79	5700	113 $\pm$ 5	1.60 (9.6)
C4-FUdR	117	1.90	100	101 $\pm$ 5	9.83 (58.9)
C5-FUdR	59	2.72	140	118 $\pm$ 4	14.2 (85.0)
C6-FUdR	38	4.25	20	104 $\pm$ 4	15.4 (92.2)
C8-FUdR	oil	6.05	1.7 $\times$ 10 <sup>-2</sup>	97 $\pm$ 6	16.5 (98.8)
C10-FUdR	34	-	3.5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	108 $\pm$ 5	15.8 (94.6)
C12-FUdR	63	-	-	102 $\pm$ 5	15.9 (95.2)

a) *n*-Octanol/0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). b) Mean $\pm$ S.E. (n=100).

c) Trapping efficiency is shown in parentheses.

Table 3 Diameter and Drug Content of PHB-MS

Compound	PHB-65		PHB-135		PHB-450	
	Diameter	Drug content	Diameter	Drug content	Diameter	Drug content
	( $\mu$ m) <sup>a)</sup>	(%) <sup>b)</sup>	( $\mu$ m) <sup>a)</sup>	(%) <sup>b)</sup>	( $\mu$ m) <sup>a)</sup>	(%) <sup>b)</sup>
FUdR	-	-	-	-	262 $\pm$ 7	5.70 (24.7)
C3-FUdR	132 $\pm$ 3	10.78 (46.7)	109 $\pm$ 3	11.66 (50.5)	246 $\pm$ 10	14.34 (62.1)
C4-FUdR	140 $\pm$ 3	16.94 (73.4)	110 $\pm$ 3	19.26 (83.4)	326 $\pm$ 8	18.67 (80.9)
C5-FUdR	101 $\pm$ 3	18.36 (79.5)	169 $\pm$ 4	21.95 (95.1)	316 $\pm$ 9	19.77 (85.7)

a) Mean $\pm$ S.E. (n=100). b) Trapping efficiency is shown in parentheses.

プロドラッグと分子量の異なる PHB として、分子量 65,000 (PHB-65), 135,000 (PHB-135)及び 450,000 (PHB-450)の高分子をそれぞれ用いて水中乾燥法で調製した PHB マイクロスフィア(PHB-MS)の性質を Table 3 に示す. PLA-MS の場合と同様に PHB-65, PHB-135 あるいは PHB-450 で調製した PHB-MS の粒子径に対する FUdR プロドラッグの種類の影響は少ないが, PHB-65 や PHB-135 の場合の平均粒子径は  $100\mu\text{m}$  程度の値を示したのに対し, 分子量の大きい PHB-450 の場合は,  $300\mu\text{m}$  と大きくなる傾向が見られた. PHB-MS の薬物含有率及び薬物取り込み効率は, プロドラッグのアシル基が長くなるに従って高くなった. PLA-MS の場合でも C5-FUdR 以上のアシル基の長いプロドラッグで高い取り込み効率を示すことから, 水中乾燥法により調製されるこれら MS については, C5-FUdR 以上の長いアシル基を有するプロドラッグ, すなわち C5-FUdR 以上の高い親油性を有するプロドラッグを用いることで, MS の薬物含有率を処方変更により定量的に調節可能であると考えられる.

## 第2節 プロドラッグ含有マイクロスフィアからの薬物放出性

第 1 節で調製した PLA-MS のうち, 比較的溶解度が高く, 実験期間中シンクの条件を保つことができた C2-FUdR~C6-FUdR 及び FUdR を含有した PLA-MS からの

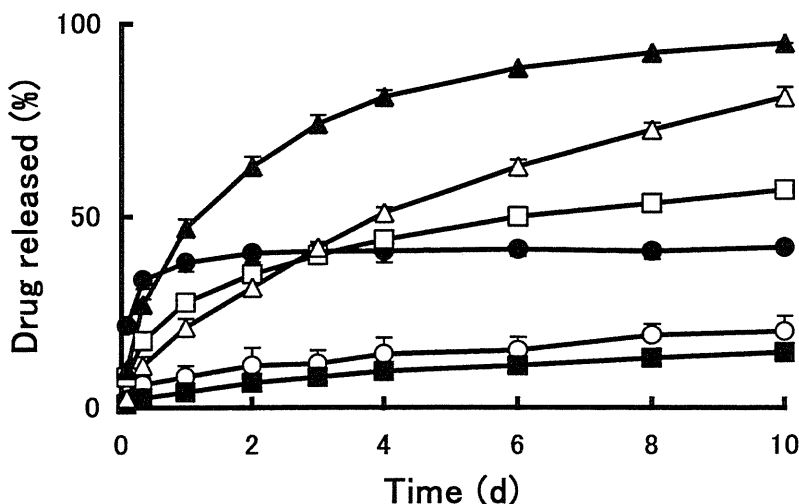


Fig. 3 Release Profiles of Drug from PLA-MS in Saline Containing 0.01% Tween 80

●, FUdR; ○, C2-FUdR; ■, C3-FUdR; □, C4-FUdR; ▲, C5-FUdR; △, C6-FUdR. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

*in vitro* 薬物放出実験を 0.01% Tween 80 含有生理食塩液中で行った(Fig. 3). FUdR 含有 PLA-MS からの FUdR 放出の場合は, 放出初期にバーストが見られた後, ほとんど薬物放出は見られなかった. PLA-MS からの C2-FUdR や C3-FUdR の薬物放出速度は非常に低く, 10 日目でもその放出率は, 10~25%程度であった. 一方, C4-FUdR, C5-FUdR や C6-FUdR の放出は比較的速く, 薬物の親油性が高くなるほど速くなる傾向が見られたが, C6-FUdR と C5-FUdR は逆転した.

また, PHB-450 の高分子を用い調製した FUdR, C3-FUdR, C4-FUdR, あるいは C5-FUdR 含有 PHB-MS について, その *in vitro* 放出を Fig. 4 に示す. PHB-MS からの FUdR 放出は比較的速く, 1 日でほぼ全量の薬物が放出した. PHB-MS からのプロドラッグの放出速度は PLA-MS の場合と比較して遅い傾向にあったが, C3-FUdR < C4-FUdR < C5-FUdR の順は変化しなかった.

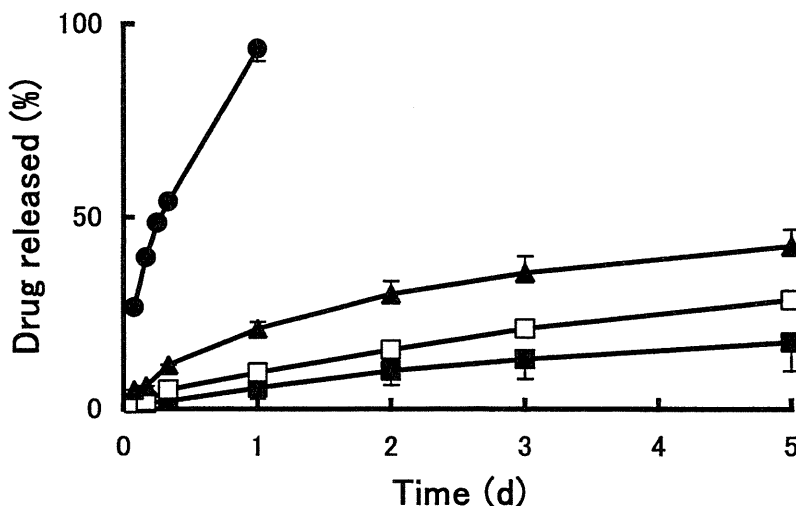


Fig. 4 Release Profiles of Drug from PHB-MS (PHB-450) in Saline Containing 0.01% Tween 80  
 ●, FUdR; ■, C3-FUdR; □, C4-FUdR; ▲, C5-FUdR. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

### 第3節 プロドラッグ含有マイクロスフィアからの薬物放出に及ぼす生体内成分の影響

C8-FUdR, C10-FUdR, C12-FUdR は, 親油性が高く, 前節で放出実験が行えなかった. しかし, 様々な製剤からの薬物放出速度が, 放出外液の性質に影響されるこ

とが知られており、これらの薬物を可溶化したり、可溶性に変化させたりする成分により放出実験が可能になると思われる。そこで、本節においては、含有された薬物がプロドラッグであることから、まず、FUdR プロドラッグを親薬物である FUdR に変換する酵素であるエステラーゼの共存下 PLA-MS の放出実験を行った(Fig. 5)。難溶性の各プロドラッグをエステラーゼにより水溶性の FUdR に変化させることで放出実験が可能となった。これらの薬物放出は全体に遅いが、炭素数の少ないプロドラッグを含む MS において、より放出の速い傾向が示された。

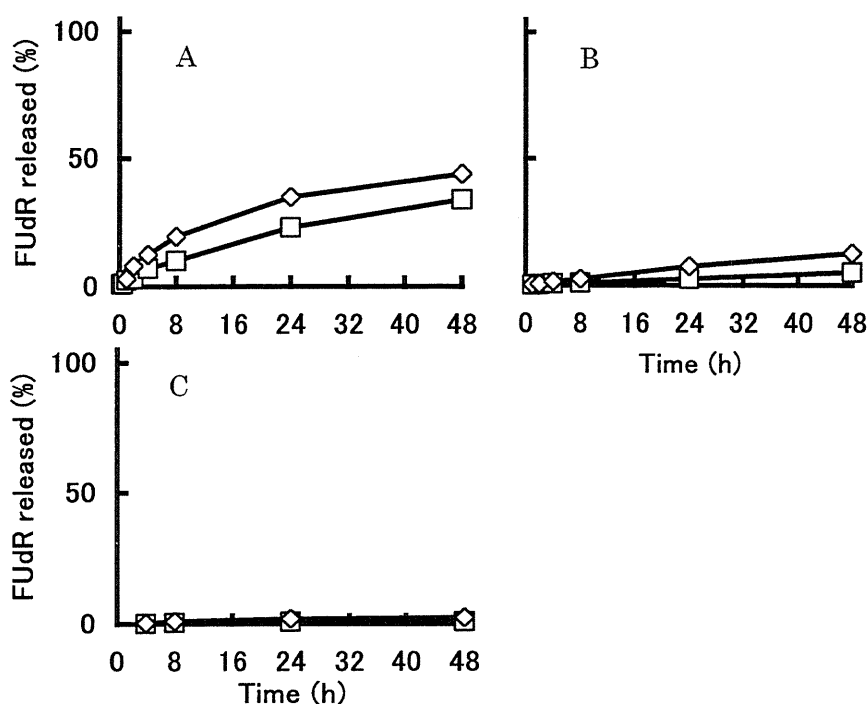


Fig. 5 Release Profiles of FUdR from PLA-MS Containing C8-FUdR, C10-FUdR, or C12-FUdR in Buffer Containing Esterase

A: FUdR released from PLA-MS containing C8-FUdR. B: FUdR released from PLA-MS containing C10-FUdR. C: FUdR released from PLA-MS containing C12-FUdR. □, buffer containing 5 units/ml esterase; ◇, buffer containing 50 units/ml esterase.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3). In all cases, the prodrug itself was not detected.

エステラーゼのような生体内に存在する成分の放出速度への影響は、MS の *in vivo* での効果と放出との関係を考える場合、重要である。前節において 0.01% Tween 80 含有生理食塩液中で放出実験が可能であった C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR を含有する MS についても、その影響を知る必要がある。そこで、C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR について PLA-MS からの薬物放出速度に及ぼすエステラーゼの濃度増加の影響を観察した(Fig. 6)。C6-FUdR 含有 PLA-MS の場合、放出液中のエステラーゼ濃度が高くなるほど FUdR 放出は速くなった。それに比較して、C4-FUdR や C5-FUdR 含有 PLA-MS からの FUdR 放出におよぼすエステラーゼの影響は小さかった。

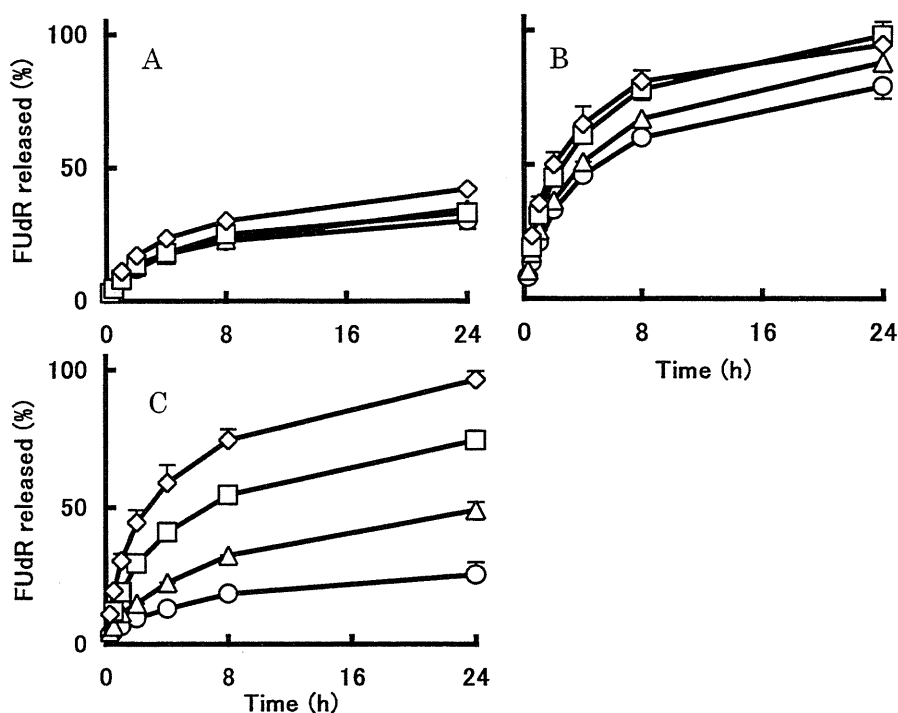


Fig. 6 Effect of Esterase on the Release of FUdR from PLA-MS

A: FUdR released from PLA-MS containing C4-FUdR. B: FUdR released from PLA-MS containing C5-FUdR. C: FUdR released from PLA-MS containing C6-FUdR. ○, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4); △, buffer containing  $5 \times 10^{-6}$  units/ml esterase; □, buffer containing 5 units/ml esterase; ◇, buffer containing 50 units/ml esterase.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3). Except for 0.1M phosphate buffer and buffer containing  $5 \times 10^{-6}$  units/ml esterase, the prodrug itself was not detected. In the case of  $5 \times 10^{-6}$  units/ml esterase, 100 units/ml esterase was added to the aliquot and incubated at 37°C for 30min to convert Cn-FUdR to FUdR.



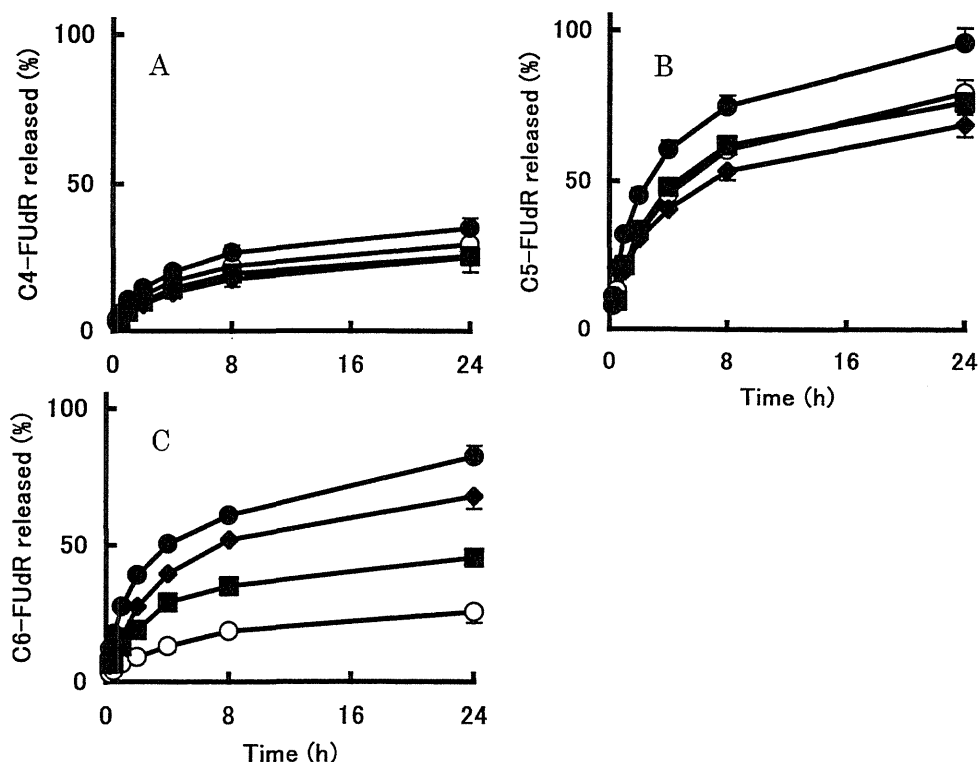


Fig. 7 Effect of Albumin on the Prodrug Release from PLA-MS

A: Effect of albumin on prodrug release from PLA-MS containing C4-FUdR. B: Effect of albumin on prodrug release from PLA-MS containing C5-FUdR. C: Effect of albumin on prodrug release from PLA-MS containing C6-FUdR. ○, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4); ■, buffer containing 0.019 mg/ml albumin (equivalent protein concentration of 5 units/ml esterase); ◆, buffer containing 0.19 mg/ml albumin (equivalent protein concentration of 50 units/ml esterase); ●, buffer containing 40 mg/ml albumin (plasma concentration).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3). In all cases, FUdR itself was not detected.

次に、血漿中に多量に存在し、界面活性作用やタンパク結合による難溶性薬物の可溶化作用を有するアルブミンを用いて、PLA-MSからの薬物放出速度に及ぼす影響を観察した(Fig. 7)。アルブミンの影響はエステラーゼと類似した傾向を示した。すなわち、C6-FUdR含有PLA-MSからの薬物放出はアルブミン濃度が高くなるほど速くなり、C4-FUdRとC5-FUdRの放出に対する効果はC6-FUdRのそれに比べて低いもの

であった。しかしながら、アルブミンの作用はエステラーゼの場合より高濃度で観察され、エステラーゼと同じプロテイン濃度(0.019 mg/ml と 0.19 mg/ml)の条件では、エステラーゼの効果と比較してその効果は小さかった。

本節の結果は、放出実験の実施に際してエステラーゼの添加が有効であることを示す一方、*in vitro* と *in vivo* での PLA-MS からの薬物放出速度に違いが生じる可能性があることを示唆した。特に、C6-FUdR の放出速度は、投与部位や標的部位におけるエステラーゼ、アルブミンやその他の生体内成分の濃度に依存することが考えられる。

#### 第4節 *In vivo* マウス P388 白血病モデルを用いた抗腫瘍効果の評価

前節までにおいては、FUdR プロドラッグ含有 PLA-MS 及び PHB-MS を調製し、その *in vitro* における薬物放出性について述べてきた。本節では、*in vivo* において P388 マウス白血病細胞を用いることにより FUdR プロドラッグおよびプロドラッグ含有 MS の抗腫瘍効果を評価し、プロドラッグやプロドラッグを含有した MS の性質との関係について考察した。

まず、MS に含有させない FUdR 及び FUdR プロドラッグ自身の効果を評価した。すなわち、P388 白血病細胞を腹腔内に移植したマウスに FUdR および FUdR プロドラッグを生理食塩液に溶解または懸濁させて腹腔内に 1 回投与した(Table 4)。FUdR と比較的アシル基の短い C3-FUdR～C6-FUdR は、同様にほとんど効果がなく、わずかに体重の上昇が観察された。一方、長いアシル基の C10-FUdR、C12-FUdR は高い効果を示した。1 日 1 回 5 日間の連日投与の場合(Table 5)、1 回投与に比べて高い効果を示し、腹腔内からの薬物の消失が速いと予測される短いアシル基のプロドラッグにおいて、その効果の増加は顕著であった。FUdR はチミジレートシンターゼ阻害を作用機序とし、癌細胞増殖時における DNA 合成期に特異的に作用する時間依存的な薬効を示すことが知られている。<sup>33, 34)</sup> これらの結果は、その殺細胞効果が薬物と腫瘍細胞の接触時間に依存し、*in vivo* での長い滞留が要求される薬物であることによるものと考えられる。

PLA-MS および PHB-450 で調製した PHB-MS を 1 回投与した時の効果をそれぞれ Table 6 と Table 7 に示す。C4-FUdR、C5-FUdR、C6-FUdR 含有 PLA-MS は顕著な効果(T/C>140%)を示し、中でも C6-FUdR 含有 PLA-MS は、75mg/kg の薬物投

与量で最大効果(153%)を示した。一方、長いアシル基の C10-FUdR および C12-FUdR 含有 PLA-MS は、用いた投与量範囲でほとんど効果を示さなかった。PHB-MS の場合は、C3-FUdR< C4-FUdR<C5-FUdR の順で効果が高く、C5-FUdR は、28mg/kg の薬物投与量で 144%であった。

Table 4 Antitumor Activity of Single Injection of FUdR and Cn-FUdR

Compound	Dose <sup>a)</sup> (mg/kg)	Weight change (0-5d, g/mouse)	Survival time (n=5, day±S.E.)	T/C (%)	Control <sup>b)</sup>
C3-FUdR	250	+0.9	10.8±0.4	102	A
	50	+1.8	10.2±0.2	96	A
	25	+0.8	11.0±0.8	104	A
C4-FUdR	250	+0.4	11.2±0.4	115	B
	50	+1.4	10.2±0.2	105	B
	25	+1.7	10.6±0.2	106	C
C5-FUdR	250	+1.6	10.2±0.4	104	D
	50	+2.6	9.8±0.2	100	D
	25	+1.5	10.2±0.2	104	D
C6-FUdR	250	+1.1	11.0±1.0	113	B
	50	+2.9	10.2±0.2	105	B
	25	+1.9	9.6±0.2	104	E
C8-FUdR	250	- 1.4	11.8±0.5	116	F
	50	- 0.4	10.8±0.6	106	F
	25	- 0.1	11.8±0.4	118	C
C10-FUdR	250	- 3.2	11.2±1.3	106	A
	50	- 1.8	13.8±0.7	130	A
	25	- 1.2	13.4±0.5	126	A
C12-FUdR	250	- 3.1	10.0±0.8	100	C
	50	- 1.9	13.0±0.0	130	C
	25	- 1.4	13.6±0.5	136	C
	5	+0.4	13.8±0.5	147	G
	2.5	+1.4	9.6±0.4	114	G
FUdR	250	+1.3	11.2±0.4	114	D
	50	+1.7	10.2±0.6	105	B

a) Dose of Cn-FUdR mg/kg or FUdR mg/kg. b) Control groups were not treated. The survival time of control groups; A, 10.6±0.2; B, 9.7±0.2; C, 10.0±0.0; D, 9.8±0.2; E, 9.2±0.2; F, 10.2±0.5; G, 9.4±0.4. The weight changes of control groups were A=+1.7, B=+2.3, C=+2.5, D=+1.6, E=+2.4, F=+1.2, and G=+2.7.

Table 5 Antitumor Activity of Five Injections (day 1, 2, 3, 4, and 5) of FUdR and Cn-FUdR

Compound	Dose <sup>a)</sup> (mg/kg/d)	Weight change (0-5d, g/mouse)	Survival time (n=5, day $\pm$ S.E.)	T/C (%)	Control <sup>b)</sup>
C3-FUdR	225	0	12.2 $\pm$ 0.2	122	A
	75	- 0.5	11.2 $\pm$ 0.2	112	A
	22.5	+0.4	10.4 $\pm$ 0.2	104	A
C4-FUdR	225	- 6.7	12.4 $\pm$ 2.3	123	B
	75	- 2.7	13.2 $\pm$ 1.6	131	B
	22.5	- 2.0	12.6 $\pm$ 0.4	125	B
C5-FUdR	750	- 2.4	9.2 $\pm$ 0.2	94	C
	225	- 2.5	14.6 $\pm$ 0.2	146	A
	75	- 1.2	13.4 $\pm$ 0.2	134	A
	22.5	- 0.7	12.4 $\pm$ 0.4	124	A
C6-FUdR	750	- 1.5	10.0 $\pm$ 0.5	102	C
	225	- 1.5	13.6 $\pm$ 0.9	135	B
	75	- 1.5	12.2 $\pm$ 0.9	121	B
	22.5	- 0.6	12.0 $\pm$ 1.3	119	B
C8-FUdR	750	- 2.8	9.0 $\pm$ 0.0	92	C
	225	- 2.0	12.6 $\pm$ 0.2	125	B
	75	- 2.9	12.2 $\pm$ 1.7	121	B
	22.5	- 2.7	11.8 $\pm$ 1.6	117	B
C10-FUdR	225	- 2.6	11.8 $\pm$ 0.2	118	A
	75	- 2.9	13.4 $\pm$ 1.0	134	A
	22.5	+0.4	14.4 $\pm$ 0.5	144	A
	7.5	+0.8	12.3 $\pm$ 0.9	131	D
	2.25	+1.2	10.5 $\pm$ 0.9	112	D
C12-FUdR	225	- 2.9	10.4 $\pm$ 0.5	102	E
	75	- 1.6	13.2 $\pm$ 1.0	129	E
	22.5	- 0.1	14.6 $\pm$ 0.4	143	E
	7.5	- 0.7	14.4 $\pm$ 0.2	144	A
	2.25	+1.3	12.8 $\pm$ 0.6	128	A
FUdR	750	- 3.0	9.4 $\pm$ 0.4	96	C
	225	- 2.1	15.4 $\pm$ 0.4	157	C
	75	- 0.1	13.0 $\pm$ 0.0	133	C
	22.5	+0.8	11.8 $\pm$ 1.1	120	C

a) Dose of Cn-FUdR mg/kg/d or FUdR mg/kg/d. b) Control groups were not treated. The survival time of control groups; A, 10.0 $\pm$ 0.0; B, 10.1 $\pm$ 0.2; C, 9.8 $\pm$ 0.2; D, 9.4 $\pm$ 0.4; E, 10.2 $\pm$ 0.2. The weight changes of control groups were A=+2.0, B=+2.9, C=+1.6, D=+2.7, and E=+2.3.

Table 6 Antitumor Activity of Single Injection of PLA-MS

Compound	Dose <sup>a)</sup> (mg/kg)	Weight change (0-5d, g/mouse)	Survival time (n=5, day $\pm$ S.E.)	T/C (%)	Control <sup>b)</sup>
C4-FUdR	145 (1500) <sup>c)</sup>	- 3.8	11.6 $\pm$ 0.9	120	B
	49 (500)	- 3.3	14.2 $\pm$ 0.8	146	B
	14.5 (150)	- 0.5	11.4 $\pm$ 0.2	118	B
	4.9 (50)	+0.6	10.8 $\pm$ 0.4	111	B
C5-FUdR	225 (1500)	- 3.1	10.4 $\pm$ 0.5	106	C
	75 (500)	- 3.3	14.2 $\pm$ 0.8	146	C
	22.5 (150)	- 1.3	12.4 $\pm$ 0.4	127	C
	7.5 (50)	- 0.1	12.0 $\pm$ 0.0	122	C
C6-FUdR	225 (1500)	- 3.4	12.0 $\pm$ 1.2	124	B
	75 (500)	- 4.0	14.8 $\pm$ 0.3	153	B
	22.5 (150)	- 3.3	13.6 $\pm$ 0.3	140	B
	7.5 (50)	- 0.2	11.4 $\pm$ 0.2	118	B
C8-FUdR	225 (1500)	- 4.1	11.8 $\pm$ 2.1	118	A
	75 (500)	- 3.3	13.6 $\pm$ 0.9	133	A
	22.5 (150)	- 1.2	12.0 $\pm$ 0.6	111	A
	7.5 (50)	+0.8	11.0 $\pm$ 0.4	108	A
C10-FUdR	225 (1500)	- 2.6	9.8 $\pm$ 1.2	97	D
	75 (500)	- 3.5	12.0 $\pm$ 1.3	119	D
	22.5 (150)	- 0.1	11.2 $\pm$ 0.4	111	D
	7.5 (50)	- 1.9	11.2 $\pm$ 0.5	111	D
C12-FUdR	225 (1500)	- 0.4	12.0 $\pm$ 0.3	119	D
	75 (500)	+1.2	10.6 $\pm$ 0.4	105	D
	22.5 (150)	+3.1	10.2 $\pm$ 0.2	101	D
	7.5 (50)	+3.2	10.0 $\pm$ 0.3	99	D
Blank MS <sup>d)</sup>	(900)	+1.8	9.2 $\pm$ 0.2	94	C

a) Dose of contained drug in PLA-MS. b) Control groups were not treated. The survival time of control groups; A, 10.2 $\pm$ 0.5; B, 9.7 $\pm$ 0.2; C, 9.8 $\pm$ 0.2; D, 10.1 $\pm$ 0.2. The weight changes of control groups were A=+1.2, B=+2.3, C=+1.6, and D=+2.9. c) Dose of PLA-MS (mg/kg) were shown in the parentheses. d) Blank MS did not contain the drug.

FUdR プロドラッグ懸濁液とプロドラッグ含有 PLA-MS および PHB-MS の薬物投与量と抗腫瘍効果の関係を比較するために、縦軸に延命日数 (increase in lifespan : T/C  $\times$  100 - 100, %) を、横軸に薬物投与量をプロットした (Fig. 8, 9). 同じ投与量で、C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR の懸濁液 1 回投与と MS として投与したときを比較すると、PLA-MS, PHB-MS のどちらでも MS 投与で顕著に効果が高い。また、

Table 7 Antitumor Activity of Single Injection of PHB-MS

Compound	Dose <sup>a)</sup> (mg/kg)	Weight change (0-5d, g/mouse)	Survival time (n=5, day±S.E.)	T/C (%)	Control <sup>b)</sup>
C3-FUdR	72 (500) <sup>c)</sup>	+0.9	10.6±0.4	99	A
	22 (150)	+1.0	10.0±0.0	94	A
	7 (50)	+0.9	9.8±0.2	92	A
C4-FUdR	94 (500)	+0.7	11.2±0.9	117	B
	28 (150)	-0.7	12.6±0.9	131	B
	9 (50)	+0.9	10.8±0.2	113	B
C5-FUdR	94 (500)	-3.2	9.0±0.8	94	B
	28 (150)	-2.7	13.8±0.6	144	B
	9 (50)	+0.4	11.4±0.2	119	B
Blank MS <sup>d)</sup>	(50)	+1.6	10.2±0.2	98	C

a) Dose of contained drug in PHB-MS. b) Control groups were not treated.

The survival time of control groups; A, 10.7±0.2; B, 9.6±0.3; C, 10.4±0.2. c) Dose of PHB-MS (mg/kg) were shown in the parentheses. d)

Blank MS did not contain the drug.

懸濁液 5 連投と比較しても MS での効果はほぼ等しいかあるいはそれ以上であり、最大効果を示す投与量もより低投与量であった。これらのことは、C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR 含有 PLA-MS が、1 回の投与でかつ総量としても低い投与量において、薬物懸濁液の連続投与よりも有効であることを示している。この効果は、MS からの C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR の適度な放出速度によると考えられる。一方、懸濁液として投与した場合に低い投与量で高い効果を示した C12-FUdR は、PLA-MS に含有させるとほとんど効果を示さなかった。これは、PLA-MS からの放出速度が極度に小さいことによると考えられる(Fig. 5)。C12-FUdR 含有 PLA-MS の効果が最大投与量で最も高く、体重変化もその投与量ではじめてマイナスに転じていることからこの考えが支持される(Table 6)。

PHB-MS と PLA-MS を比較した場合、ほぼ同様な有効性が示されたが、C4-FUdR と C5-FUdR において、最大効果の得られる投与量が PHB-MS の方が低かった。In vitro の放出速度は PLA-MS の方が PHB-MS より速いので、この結果は一見放出実験の結果と一致しない。PHB-MS に関しては、生体成分の放出への影響を検討していないが、この矛盾は in vivo での放出の違いに関係していることも考えられる。

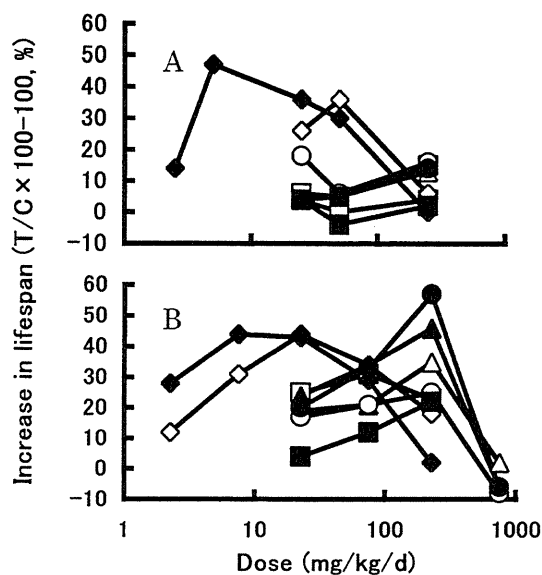


Fig. 8 Antitumor Activity of Injection of Cn-FUdR Suspension

A: Single injection of Cn-FUdR Suspension. B: Five injections of Cn-FUdR Suspension. ■, C3-FUdR; □, C4-FUdR; ▲, C5-FUdR; △, C6-FUdR; ○, C8-FUdR; ◇, C10-FUdR; ◆, C12-FUdR; ●, FUdR.

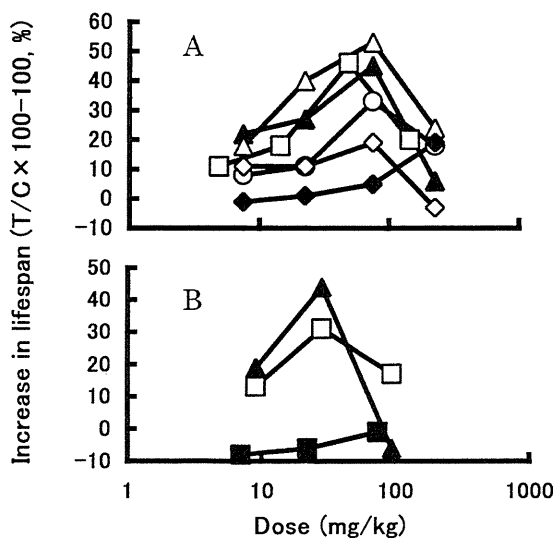


Fig. 9 Antitumor Activity of Single Injection of PLA-MS or PHB-MS

A: Single injection of PLA-MS. B: Single injection of PHB-MS. ■, C3-FUdR; □, C4-FUdR; ▲, C5-FUdR; △, C6-FUdR; ○, C8-FUdR; ◇, C10-FUdR; ◆, C12-FUdR.

## 第5節 小括並びに考察

薬物の分子修飾によるプロドラッグ化と高分子 MS の利用という2つのアプローチのコンビネーションは、抗癌剤の効力を高めるために極めて有望な方法であると思われる。本実験において、FUdR の糖部水酸基を直鎖飽和脂肪酸でアシル化したプロドラッグは、広範囲な物理化学的性質を示し、MS の調製法として簡便なことから広く用いられてきた水中乾燥法により調製した PLA-MS や PHB-MS へのプロドラッグの取り込みは、プロドラッグのアシル基を長くすることにより改善された。C5-FUdR 以上の親油性を有するプロドラッグを用いることで、MS の薬物含有率を処方変更により定量的に調整することが可能である。さらに、*in vitro*において、PLA-MS からの C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR や PHB-MS からの C5-FUdR は適度な速度で徐放化され、*in vivo*においても高い抗腫瘍効果を示した。逆に、プロドラッグ自身に、抗腫瘍効果に対して有効性が示された C12-FUdR を含有した PLA-MS の場合、その小さすぎる放出速度のため、ほとんど効果を示さなかった。

上述したように、*in vitro*での薬物放出性と *in vivo*における抗腫瘍効果にはある程度の相関が見られた。しかし、一方で、MS からの薬物放出速度は、放出液中の生体内成分の有無で少なからず影響を受けることが明らかとなり、特に、高い抗腫瘍効果を示した C6-FUdR 含有 PLA-MS では、このプロドラッグを親薬物に変換させるエステラーゼやアルブミンの濃度に依存し、顕著に放出速度が速くなった。このことは、治療上、患者の病態、個体差により放出速度が異なる可能性を示唆しており、さらに、製剤開発においても、*in vitro*と *in vivo*における薬物放出速度の違いから、製剤設計時に設定する放出速度を、*in vitro*において決定することが困難となる等の問題を示唆している。すなわち、理想的な製剤が有する1つの特徴である「*in vivo*においても計画された速度で薬物を放出する」という製剤を設計する上で、このことは、大きな問題となるに違いない。この放出速度に関する問題の本質やその打開策については、次章に譲る。



## 第2章 プロドラッグ含有高分子マイクロスフィアからの薬物放出メカニズムに関する検討<sup>48-50)</sup>

前章までにおいて、薬物自身をプロドラッグ化することで、その物理化学的性質を変更し、*in vitro*でのMSからの薬物放出速度を修飾できることを示した。しかし、それらMSからの*in vitro*薬物放出速度は、生体内成分であるアルブミンやエステラーゼの存在により大きく影響を受けることも明らかとなった。

高分子の物理化学的性質の観点から見ると、前章で用いたPLAやPHBは、いずれも結晶性が高い。そしてこのことが前章で観察されたMSからの放出特性と関係していると思われる。近年の高分子化学、工学の進歩とともに、様々な生体適合性の高い生体内分解性高分子が次々と開発され、その物性も、結晶性、非晶性、ペースト状、ろう状等、多岐にわたり、生体内分解性高分子の選択性が広がりつつある。このような状況下、*in vivo*においても最適な放出速度を示す製剤を設計するための基礎検討として、種々物性の異なる高分子MSからの種々物性の異なる薬物の放出メカニズムを明らかにし、両者の物性と放出メカニズムの関係の解明が必要であると考えた。

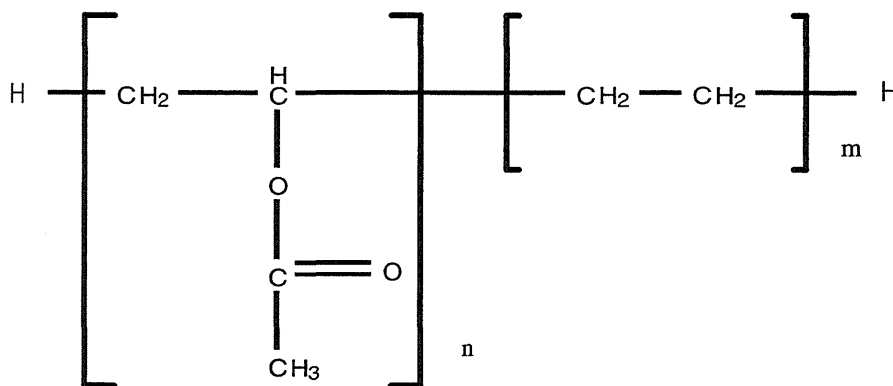


Fig. 10 Structure of Ethylene-Vinyl Acetate Copolymer

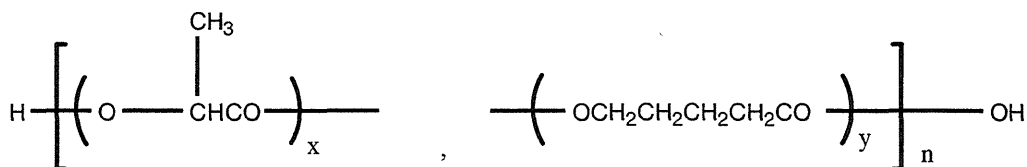


Fig. 11 Structure of L-Lactic acid- $\delta$ -Valerolactone Copolymer

そこで、本章ではまず、結晶性高分子である PLA で調製した PLA-MS からの薬物放出メカニズムの解明を試み、その薬物放出速度に影響を及ぼす要因について考察した。そして比較を目的として、生体内分解性ではないが、典型的なゴム状高分子であるエチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA, Fig. 10)をモデル高分子として用い、ゴム状態での MS からの薬物放出特性について詳細な検討を行い、更にガラス転移温度が 25℃で、MS 調製温度や保存温度ではガラス状態で、体温付近ではゴム状態となる生体内分解性の L-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体(PLV, Fig. 11)<sup>5.1)</sup>を用いて MS を調製し、それからの薬物放出メカニズムについて検討した。

## 第1節 マイクロスフィアからの薬物放出メカニズムの解析に関する理論

球形マトリックスからの薬物放出過程を表す式は、薬物の含量がマトリックス中の溶解度以下であるか以上であるか、薬物の移動がマトリックス実質部分で生じるかマトリックスに生じた割れ目や穴において生じるか等により異なり、Higuchi,<sup>5.2)</sup>や Baker と Lonsdale によりまとめられている。<sup>5.3)</sup>

薬物がマトリックス中に完全に溶解して存在し、溶けた薬物がマトリックス実質を拡散して移動する場合(Fig. 12A)、次式が適合する。

$$F=6(Dt/r^2\pi)^{1/2}-3Dt/r^2 \quad (F<0.4) \quad (1a)$$

$$F=1-(6/\pi^2)\exp(-\pi^2Dt/r^2) \quad (F>0.6) \quad (1b)$$

ここで、F は放出分率、D はマトリックス中での薬物の拡散係数、r はマトリックス半径である。

薬物がマトリックス中での溶解度以上に含まれ懸濁粒子が存在する場合で、薬物の移動がマトリックス実質への溶解と拡散により生じ、その拡散過程が放出の律速段階である場合(Fig. 12B-1)、次式が適合する。

$$(3/2)[1-(1-F)^{2/3}]-F=(3DC_{ms}/r^2C_0)t \quad (2)$$

ここで  $C_{ms}$  はマトリックス中への薬物溶解度、 $C_0$  はマトリックス中の初濃度である。

薬物がほとんどマトリックス実質中に溶解せず、放出がマトリックス中に形成された薬物が存在する割れ目や穴へ浸入した溶媒への薬物の溶解と溶媒が浸入した通路での逆方向の拡散により生じる場合(Fig. 12B-2), 次式の適用が考えられる.

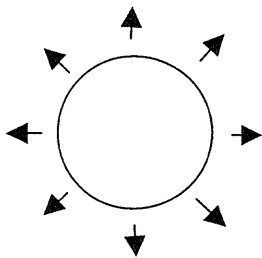
$$(3/2) [1-(1-F)^{2/3}]-F=(3D_wC_{ws}K/r^2 \tau) t \quad (3)$$

ここで  $D_w$  は放出液中の薬物拡散係数,  $C_{ws}$  は放出液中への薬物溶解度,  $K$  は薬物の比容積,  $\tau$  は放出路の曲路率である.

式(2), (3)は時間  $t$  に対して左辺をプロットすれば, 直線関係が得られる. ゆえに, 放出速度定数  $k$  は次式により定義される.

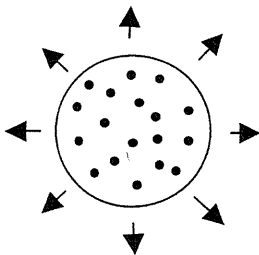
$$(3/2) [1-(1-F)^{2/3}]-F=kt \quad (4)$$

A



B

B-1



B-2

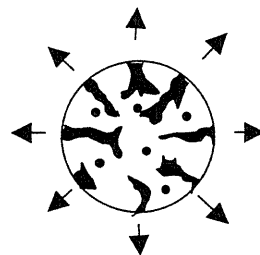


Fig. 12 Three Models for Drug Release from Spherical Matrix

A: Drug dissolved matrix (Homogeneous matrix). B: Drug suspended matrix; B-1: Homogeneous matrix, B-2: Granular matrix.

MS からの薬物の放出がこれらのどの式に適合するかを予測するには、薬物含有率の異なる MS からの放出を比較するのが簡便な方法である。もし、放出機構が式(1)に当てはまるなら、単位時間当りの放出率  $F$  の変化で表される放出速度は薬物の MS 中の初濃度に比依存的である。一方、式(2)が適合する場合、右辺の分母に  $C_0$  があるため、 $F$  の次元で表される放出速度は薬物初期含有率の増加に伴い減少する。また、式(3)の場合、薬物の初期含有率の増加により  $\tau$  の減少が予想され、それに伴う放出速度の増加が観察されるはずである。

## 第2節 ポリ-L-乳酸マイクロスフィアからの薬物放出メカニズム

第1章で評価を行った PLA-MS について、本章第1節で述べた理論をもとにその薬物放出機構を検討するため、各プロドラッグを種々含有率で取り込ませた PLA-MS を調製した。その調製時、高分子 100mg に添加した薬物量と調製後の薬物含有率を Table 8 に示す。まず、含有率の異なる C5-FUdR 含有 PLA-MS からの薬物放出実験を 37℃ で 24 時間行った。それら薬物放出速度を比較するために、薬物放出実験結果

Table 8 Amount of Drug Used for  
Preparation of PLA-MS and  
Resultant Drug content in  
PLA-MS

Drug	Amount of Drug for preparation (mg)	Drug content (%)
C3-FUdR	20.0	1.6
C4-FUdR	20.0	9.8
C5-FUdR	20.0	14.2
C6-FUdR	20.0	15.4
C5-FUdR	1.0	0.7
C5-FUdR	5.0	3.6
C5-FUdR	10.0	6.9
C5-FUdR	12.5	8.8
C3-FUdR	50.0	8.8
C4-FUdR	15.5	8.8
C6-FUdR	11.6	8.8

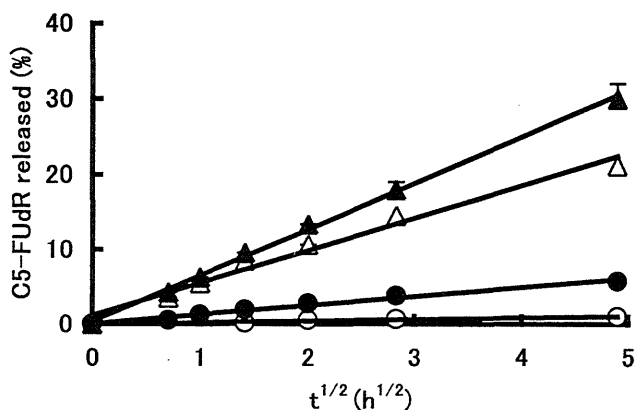


Fig. 13 Linear Higuchi Plots for C5-FUdR Release from PLA-MS

Drug content: ○, 0.7%; ●, 3.6%; △, 6.9% ▲, 8.8%. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

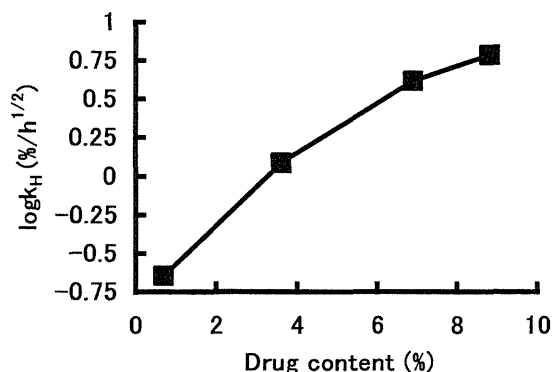


Fig. 14 Effect of Drug Content in PLA-MS Containing C5-FUdR on  $k_H$  at 37°C

を、薬物放出が拡散律速である場合に一般に広く用いられている Linear Higuchi plot (薬物放出率の  $t^{1/2}$  に対するプロット)<sup>5,4)</sup> した(Fig. 13). そして、それら直線の傾きから見かけの放出速度定数( $k_H$ )を求め、その  $k_H$  の対数を薬物含有率に対してプロットした(Fig. 14). C5-FUdR 含有 PLA-MS において、明らかに MS 中の初期含有率が高くなるに従い、その薬物放出は速くなることが示された. これは、理論式(1)及び(2)で表されるメカニズムすなわち薬物が高分子マトリックス実質中を拡散するモデルにおいては起こり難い現象で、式(3)において説明される状況であると推察した. そこで、C5-FUdR に限らず他のプロドラッグについても、MS 中にほとんど溶けず、放出が

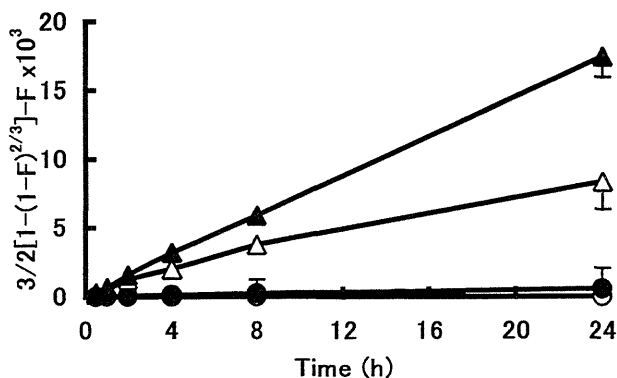


Fig. 15 Relationship between Calculated Values of  $3/2[1-(1-F)^{2/3}]-F$  and Time for C5-FUdR Release from PLA-MS

Drug content: ○, 0.7%; ●, 3.6%; △, 6.9%; ▲, 8.8%. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

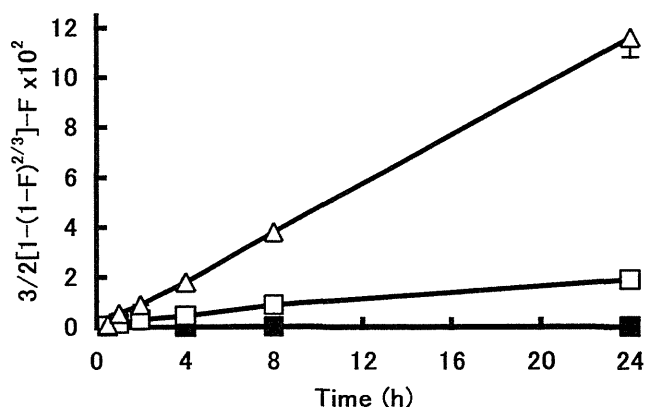


Fig. 16 Relationship between Calculated Values of  $3/2[1-(1-F)^{2/3}]-F$  and Time for C3-FUdR, C4-FUdR, or C6-FUdR Release from PLA-MS

■, C3-FUdR (Drug content: 1.6%); □, C4-FUdR (Drug content: 9.8%); △, C6-FUdR (Drug content: 15.4%). Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

MS 中に形成された薬物の存在する割れ目や穴へ浸入した外液に溶解し拡散することにより生じると仮定し、式(3)の適用を試みた。すなわち、各時間の放出率から式の左辺を計算して時間に対してプロットした(Fig. 15, 16)。Fig. 15 において、各含有率の C5-FUdR 含有 MS において、直線性が示され、その傾き  $k$  (放出速度定数)は、初期含有率の増加と共に大きくなった。また、Fig. 16 において、他のプロドラッグについて

も放出初期において良好な直線関係が示された。これらの結果は、PLA-MS からのプロドラッグの放出機構に式(3)の適用が妥当であることを示唆している。薬物はマトリックスに形成された割れ目や穴に存在し、薬物の初期含有率の増大によりそれらが結合して曲路率  $\tau$  の減少を招いたものと考えられる。

さらに、放出速度におよぼすアシル基の長さの影響を明らかにすることを目的に、薬物含有率の影響を避けるため、薬物含有率の等しい PLA-MS を調製した。PLA-MS からの FUdR プロドラッグの放出機構が、式(3)により表されるなら、薬物含有率の等しい PLA-MS の放出速度は、 $C_{ws}$  と  $D_w$  に影響されるであろう。そこで FUdR プロドラッグをそれぞれ 8.8%含有するように MS を調製し、それらからの放出について実験を行い、式(3)の左辺を時間に対してプロットした (Fig.17)。薬物放出速度は、FUdR プロドラッグの水への溶解度の順と一致し、その放出経路に水が浸入していることが示唆された。この結果もまた、PLA-MS からのプロドラッグ放出が、式(3)が表す機構すなわち、プロドラッグが MS 中にほとんど溶けず、MS 中に形成された割れ目や穴に存在し、薬物がそこに浸入した外液に溶解し拡散により放出される機構である妥当性を示唆している。第 1 章第 2 節で示されたプロドラッグの種類による放出速度の違いは、薬物含有率と水への溶解度の両方の違いにより決定されたものと考えられる。

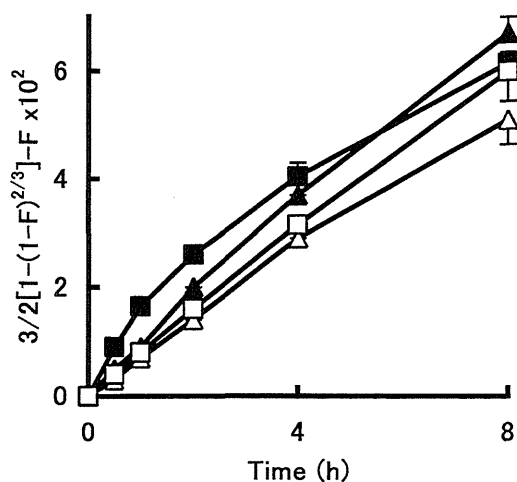


Fig. 17 Effect of  $C_{ws}$  on the Release of Cn-FUdR from PLA-MS

■, C3-FUdR; □, C4-FUdR; ▲, C5-FUdR; △, C6-FUdR. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

本節においては、PLA-MS からの薬物放出速度がその薬物の放出液への溶解度よりも薬物含有率によってより大きく影響されることを明らかにした。このことは、薬物放出制御の面で意義深いと考えられ、親油性プロドラッグを PLA-MS に用いることにより、薬物含有率を調節することで、必要とされる放出速度を示す PLA-MS が調製可能であると考えられた。しかし、一方で、本節において明らかにした薬物放出機構においては、外液への溶解と外液中での拡散を放出過程に含むために、外液の性質に影響されやすい放出機構であると考えられる。事実、第 1 章第 3 節で示した PLA-MS からの放出速度が放出液中のエステラーゼやアルブミンにより速められた。この理由について、エステラーゼの場合は、親油性の Cn-FUdR を親水性の FUdR に変換する酵素であるため、薬物の放出液への溶解度を上昇させることにより放出速度を高めたものと考えられ、一方、アルブミンの場合は、薬物のタンパク結合やアルブミンの持つ界面活性作用による薬物の見かけの溶解度の上昇やぬれの改善等の寄与が推察でき、いずれもこの放出機構との関連から説明可能である。In vivo においても計画された放出速度を再現するためには、PLA や PHB 等の結晶性の高い高分子を用いた場合、設計初期から、これらのことを念頭に置く必要がある。

### 第 3 節 エチレン-酢酸ビニル共重合体マイクロスフィアからの薬物放出メカニズム

前節において、本章第 1 節に基づき、PLA-MS からの薬物放出機構を解析し、それが MS 中の割れ目や穴を通して浸入する放出液への溶解と、その浸入液を逆に通過する拡散によることを示し、またその機構が PLA が結晶性が高いことと関係していると考えた。そこで本節では、放出温度でゴム状態で存在することが知られているエチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA)を用い、本章第 1 節の理論によって正しくゴム状態の MS からの薬物放出が記述できるかを確認するとともに、ゴム状態高分子の MS の放出特性について基礎的な検討を行った。薬物には、C3-FUdR、C4-FUdR、C5-FUdR、C6-FUdR の 4 種を用い、水中乾燥法により EVA マイクロスフィア(EVA-MS)を調製した。Table 9 に、調製時に高分子 100mg に添加した薬物量と調製後の薬物含有率及び平均粒子径を示した。調製した EVA-MS の粒子径は、100~150  $\mu\text{m}$  程度であり、薬物の違いや薬物含有率の違いによる影響は示されなかった。これら EVA-MS の *in vitro* 薬物放出実験を行った。それぞれの放出速度を比較するため、本章第 2 節同様、放出実験結果を Linear Higuchi plot し(Fig. 18)、見かけの放出速度定数( $k_H$ )を求め、



Table 9 Amount of Drug Used for Preparation of  
EVA-MS, Drug Content in EVA-MS, and  
Diameter of EVA-MS

Drug	Amount of drug for preparation (mg)	Drug content (%)	Diameter ( $\mu\text{m} \pm \text{S.E.}$ , $n=50$ )
C3-FUdR	20.0	1.67	$135 \pm 7$
C3-FUdR	40.0	6.24	$148 \pm 8$
C4-FUdR	5.0	0.62	$141 \pm 6$
C4-FUdR	10.0	1.88	$121 \pm 8$
C4-FUdR	20.0	8.52	$125 \pm 8$
C4-FUdR	30.0	15.3	$156 \pm 9$
C4-FUdR	40.0	18.5	$131 \pm 9$
C5-FUdR	1.0	0.32	$112 \pm 7$
C5-FUdR	5.0	1.86	$122 \pm 13$
C5-FUdR	10.0	5.61	$105 \pm 10$
C5-FUdR	20.0	10.6	$125 \pm 8$
C5-FUdR	30.0	15.3	$127 \pm 9$
C5-FUdR	40.0	20.4	$105 \pm 7$
C5-FUdR	60.0	30.7	$109 \pm 6$
C5-FUdR	70.0	36.5	$111 \pm 7$
C6-FUdR	10.0	6.77	$128 \pm 8$
C6-FUdR	20.0	13.8	$127 \pm 7$
C6-FUdR	40.0	27.0	$139 \pm 8$
C6-FUdR	60.0	33.7	$166 \pm 7$

各 EVA-MS の  $k_H$  の対数を薬物含有率に対してプロットした(Fig. 19). 比較的親水性の C3-FUdR を含有する EVA-MS では, 初期含有率の増加に伴い  $k_H$  の減少が観察された. 一方, 親油性の C6-FUdR を含有する EVA-MS では, 初期含有率の違いによる  $k_H$  への影響はほとんど観察されなかった. 中間の性質を示す C4-FUdR と C5-FUdR では, 低含有率において  $k_H$  の変化は見られないが, 高含有率においてはその含有率の増加に伴う  $k_H$  の減少が観察された. この結果を第 1 節の理論をもとに考察すると, すべての条件で放出はマトリックス中の拡散により制御されており, C3-FUdR の放出においては薬物の懸濁状態と仮定した式(2)が, C4-FUdR と C5-FUdR においては低含有率の時に薬物の溶解を仮定した式(1), 高含有率の時に式(2)が, C6-FUdR においては行った範囲の含有率において薬物が溶解状態にある式(1)がそれぞれ適合する

と考えられる。比較的親水性の C3-FUdR が EVA-MS 中に懸濁状態で取り込まれているのに対し、親油性の C6-FUdR が溶解状態で取り込まれており、中間の C4-FUdR と C5-FUdR が低含有率では溶解状態で、高含有率では懸濁状態で取り込まれているとするこの考えは、親油性の高分子である EVA と薬物との親和性を考慮すると妥当であると思われる。さらに、マトリックス中での薬物の移動が PLA-MS の場合と異なり、MS 中に形成された割れ目や穴で起こるのではなく MS 実質中で起こることを示唆するこの結果は、EVA が結晶性ではなくゴム状高分子であることから妥当であると考ええる。

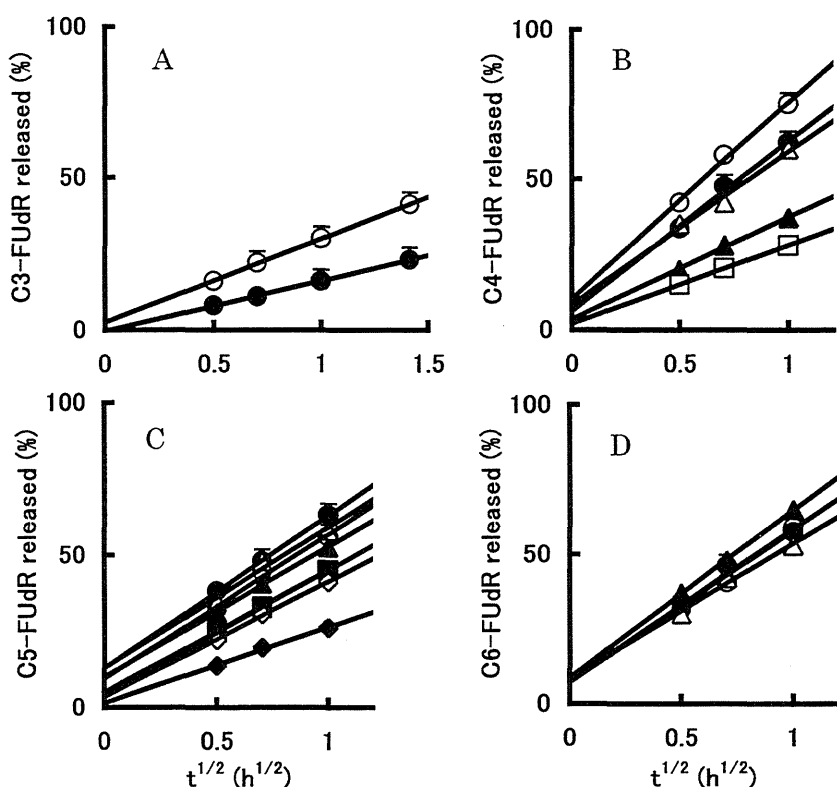


Fig. 18 Linear Higuchi Plots for Drug Release from EVA-MS  
A: Release of C3-FUdR, C3-FUdR content, ○, 1.67%; ●, 6.24%. B: Release of C4-FUdR, C4-FUdR content, ○, 0.62%; ●, 1.88%; △, 8.52%, ▲, 15.3%; □, 18.5%. C: Release of C5-FUdR, C5-FUdR content, ○, 0.32%; ●, 1.86%; △, 5.61%; ▲, 10.6%; □, 15.3%; ■, 20.4%; ◇, 30.7%; ◆, 36.5%. D: Release of C6-FUdR, C6-FUdR content, ○, 6.77%; ●, 13.8%; △, 27.0%; ▲, 33.7%. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

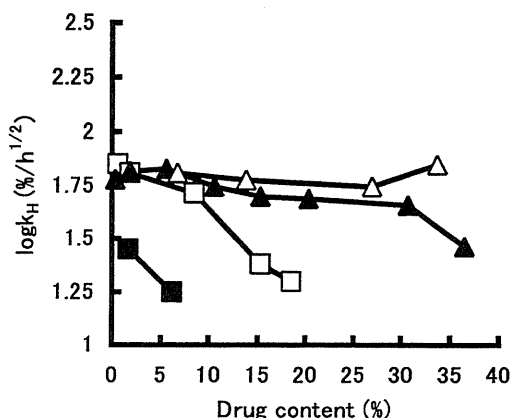


Fig. 19 Effect of Drug Content in EVA-MS on  $k_H$

■, C3-FUdR; □, C4-FUdR; ▲, C5-FUdR; △, C6-FUdR.

EVA マトリックス中の FUdR プロドラッグの移動現象をより詳細に検討するため、EVA を用いて調製した膜透過試験を C3-FUdR, C4-FUdR, C5-FUdR について行い、EVA マトリックス中の薬物拡散係数の測定を試みた。典型的な透過プロファイルとして C5-FUdR の累積透過量・時間曲線を Fig. 20 に示す。透過のパラメータは、非線型最小二乗法<sup>5.5)</sup>により次式<sup>5.6)</sup>にデータを当てはめることにより求めた。

$$Q = (DmPCws/L) (t - L^2/6Dm) - (2PCwsL/\pi^2) \sum_{n=1}^{\infty} \{(-1)^n/n^2\} \exp(-n^2\pi^2Dmt/L^2) \quad (5)$$

ここで  $Q$  は単位面積当りの累積透過量、 $P$  は薬物の膜・水間の分配係数、 $Cws$  は薬物の水への溶解度、 $L$  は膜の厚さであり、 $Cws$  と  $L$  に実測値を用い、未知のパラメータとして EVA マトリックス中の薬物拡散係数  $Dm$  とマトリックス・水薬物分配係数  $P$  を求めた (Table 10)。得られた  $Dm$  の値は薬物間でほとんど差がなく、アシル基の長さの違いによる分子量のわずかな増加は EVA 中の拡散性にほとんど影響しないことが示された。この結果は、薬物を溶解状態で含んでいると考えられる EVA-MS では、薬物が異なっても  $k_H$  の値はほぼ等しい放出実験結果とよく一致している。式(1)に従う状況では、放出は拡散制御であり、薬物の親油性は薬物の放出速度に影響しないと考えられる。一方、分配係数  $P$  は薬物の親油性の増加に伴い増加した。この結果は、EVA マトリックスへの薬物の溶解性が親油性プロドラッグにおいて高いと予想された

EVA-MS からの放出実験の結果と一致している。

Table 10      Diffusion Parameters of FUdR  
Prodrugs through EVA Membrane

Compound	Dm (cm/h) × 10 <sup>5</sup>	P
C3-FUdR	1.11 ± 0.08	0.806 ± 0.012
C4-FUdR	1.19 ± 0.12	15.0 ± 2.0
C5-FUdR	0.935 ± 0.036	65.6 ± 2.1

Mean ± S. E. (n=3).

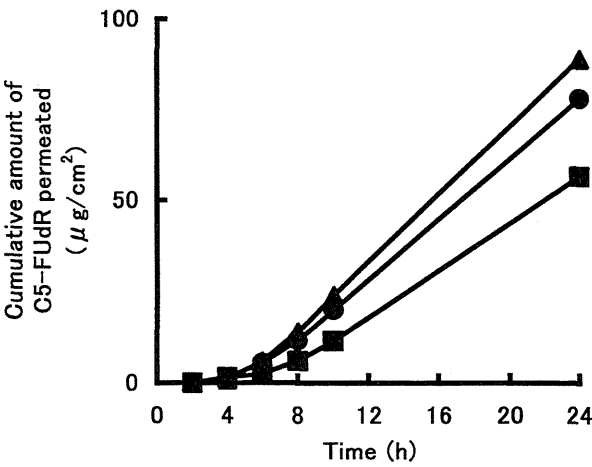


Fig. 20      Permeation of C5-FUdR through EVA Membrane  
Membrane thickness: ●, 0.019cm; ▲, 0.019cm; ■, 0.021cm.

薬物が溶解状態で含まれていると考えられる EVA-MS からの薬物放出が厳密に式 (1)に従い, さらには放出実験から決定される拡散係数  $D$  の値が, 膜透過実験で得られた拡散係数  $D_m$  と同等であるかどうかを確認することを試みた. 式(1)は本来球形マトリックスからの放出を表す式であり, 単分散の MS からの放出にはそのまま適用可能であるが, 粒子径に分布がある場合, 解析に粒度分布を組み込む必要がある.<sup>19)</sup> そこで式(1)の適合性を評価するために, 粒子径 0.13cm の C5-FUdR 含有球形マトリックスを調製し, 1 個のマトリックスからの生理食塩液への放出を測定した(Fig. 21). Fig. 21 には, 拡散係数  $D$  に膜透過実験で得られた  $D_m$  の値を, マトリックス半径  $r$

に実測値をそれぞれ式(1)に代入して計算した理論曲線を重ねて示した。理論曲線と実測値はよく一致しており、この拡散モデルの適用の妥当性および水中乾燥法で調製した EVA 球形マトリックスと EVA 膜における C5-FUdR の拡散係数の同等性が示された。C5-FUdR はこの含有率(6.08%)においてマトリックス中に溶解して存在し、そこでの拡散係数が放出の律速段階であると考えられる。また、EVA 膜と EVA-MS での拡散係数が同等であったということから、溶解度以下の含有率であれば、膜透過実験から、MS からの放出プロファイルが予測可能である。

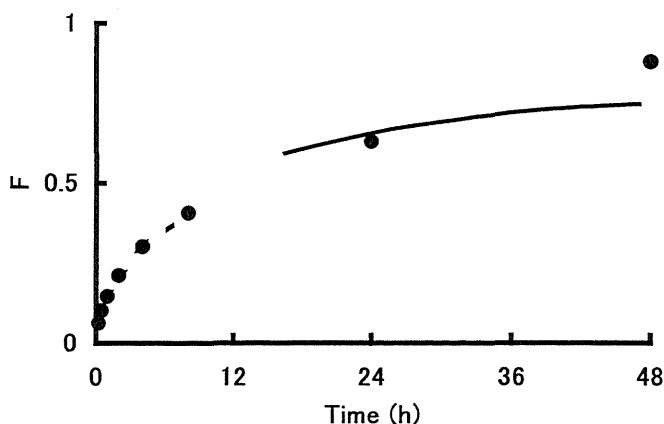


Fig. 21 Relationship between Observed and Calculated Values of Amount of C5-FUdR Released from EVA Spherical Matrix

●, observed values; ----, calculated values (eq. 1a); —, eq. 1b. Diameter of EVA matrix is 0.13cm. Initial concentration of C5-FUdR in EVA matrix was 6.08%. Diffusivity of C5-FUdR in EVA membrane ( $9.35 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{h}$ ) was used for the calculation.

#### 第 4 節 L-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体マイクロスフィアからのガラス転移温度以上の温度における薬物放出メカニズム

PLA-MS からの薬物放出機構が、マトリックスの高分子中での拡散ではなく、薬物が存在する割れ目や穴に浸入した放出液への溶解や拡散によるものであるのに対し、ゴム状態である EVA-MS からの薬物放出機構は、マトリックス高分子中での拡散であることを示し、PLA-MS の薬物放出性における欠点を克服できる可能性が示唆された。しかし、実際ゴム状態の高分子で MS を調製した場合、保存時の MS どうしの凝集、付着、変形、保存中の薬物放出等、やわらかい故に生じる別の問題がある。非晶性高

分子においては、ガラス転移温度( $T_g$ )を境に、物性も急激に変化し、 $T_g$ 以下の温度では、高分子鎖の運動が低くかたいガラス状態を呈し、温度が $T_g$ 以上になると、高分子鎖の運動の活発なゴム状態となる。PLAと類似の生体適合性の高い生体内分解性高分子であるL-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体(PLV)には $T_g$ が体温以下でそれを境にガラスとゴムで相変化するものがある。<sup>51)</sup>もし、そのようなPLVを用いてMSを調製すれば、 $T_g$ 以下の温度で保存した場合、かたく保存性がよく、体温においてゴム状態に変化して理想的な放出性を示すことが期待できる。

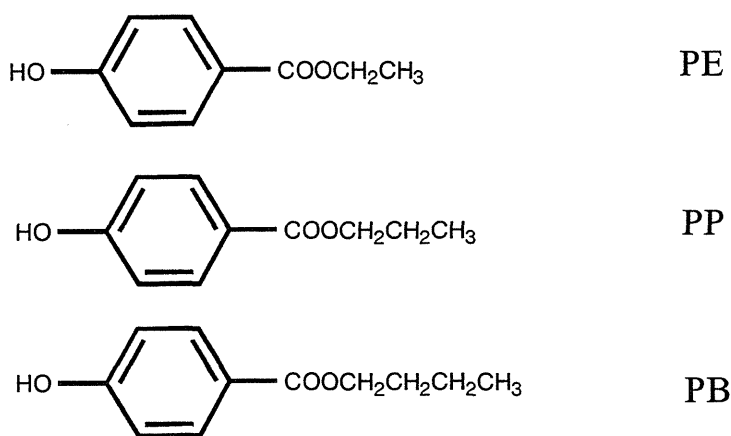


Fig. 22 Structure of PE, PP, and PB

本節では、モデル薬物として *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル(PE)、プロピル(PP)、ブチル(PB)を (Fig. 22)、生体内分解性高分子としてPLV (L-乳酸： $\delta$ -バレロラクトン = 90：10 mol%, MW: 11,400,  $T_g$ =25℃)を用いたPLVマイクロスフィア(PLV-MS)を水中乾燥法により調製し、 $T_g$ 以上の温度すなわちゴム状態でのPLV-MSからの薬物放出メカニズムについて検討し、さらに放出性に及ぼす放出液の性質の影響について検討した。

Table 11に、薬物の見かけの分配係数の $\log P$ 、調製時に高分子100mgに添加した薬物量、調製後の薬物含有率、及び平均粒子径を示した。調製したPLV-MSの粒子径は、50 $\mu$ m程度であり、薬物の違いや薬物含有率の違いによる影響は示されなかった。

Table 11 Apparent Partition Coefficients of Drugs, Amount of Drug Used for Preparation of PLV-MS, Drug Contents in PLV-MS, and Median Diameter of PLV-MS

Drug	logP <sup>a)</sup>	Amount of drug for preparation (mg)	Drug content <sup>b)</sup> in PLV-MS (%)	Median diameter <sup>b)</sup> ( $\mu$ m)
PE	1.33	7	0.57 $\pm$ 0.01	53.16 $\pm$ 2.00
PE		14	1.15 $\pm$ 0.06	52.40 $\pm$ 1.52
PE		20	1.71 $\pm$ 0.06	55.89 $\pm$ 2.98
PP	1.86	7	1.30 $\pm$ 0.06	54.14 $\pm$ 2.16
PP		14	2.59 $\pm$ 0.11	49.14 $\pm$ 1.80
PP		20	3.71 $\pm$ 0.17	48.57 $\pm$ 1.12
PB	2.45	7	1.65 $\pm$ 0.21	55.34 $\pm$ 1.83
PB		14	4.02 $\pm$ 0.44	49.46 $\pm$ 2.29
PB		20	7.29 $\pm$ 0.46	50.46 $\pm$ 1.50

a) Dichloromethane/water system at 4°C. b) Mean $\pm$ S.E. (n=3).

PLV-MS からの薬物放出メカニズムを明らかにする目的で、各 PLV-MS について Tg 以上の温度である 42°C と、比較のため Tg 以下の温度である 17°C 下で 6 時間放出実験を行った。それら放出速度を比較するため、放出実験の結果を Linear Higuchi plot し(Fig. 23), 見かけの放出速度定数( $k_H$ )を求め、 $k_H$  の対数をそれぞれの薬物含有率に対しプロットした(Fig. 24)。42°C の場合、PB 含有 PLV-MS で含有率の上昇に対する  $k_H$  の減少が見られ、一方 PE, PP では、含有率に対する明確な依存性は示されなかった。これは、マトリックスがゴム状態の EVA-MS と類似した傾向であり、PLV-MS においても薬物放出はマトリックス実質中の拡散により生じており、PE と PP はマトリックス中に溶解、PB はマトリックス中に懸濁していると考えられる。各薬物の融点への PLV の影響を調べた DSC での検討では、融点降下がそれぞれ PE で 20.3°C, PP で 11.6°C であったのに対し PB で 2.6°C であり、このことも PB のみ PLV への溶解性が低いという考えを支持している。一方、17°C の場合、全ての薬物で薬物含有率の上昇にともなう  $k_H$  の上昇が見られ、薬物の拡散がマトリックス実質中で生じない PLA-MS の場合と類似していた。

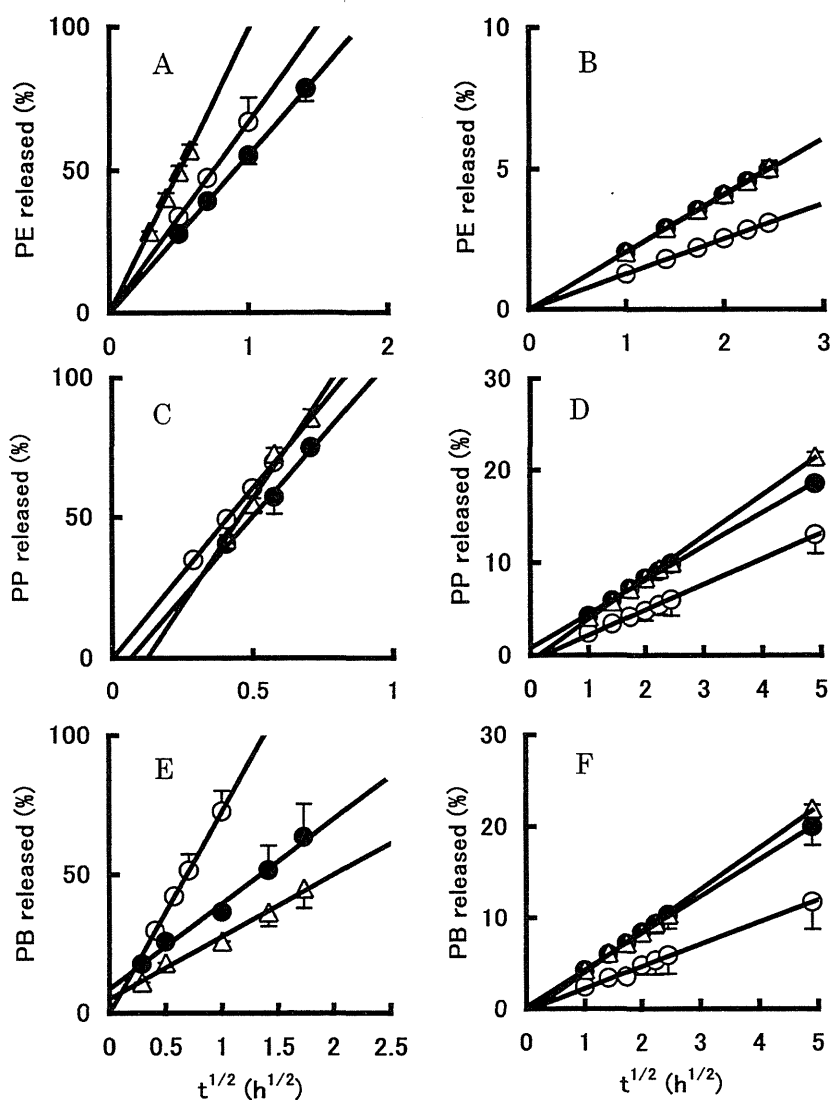


Fig. 23 Linear Higuchi Plots for Drug Release from PLV-MS

A: Release of PE at 42°C, PE content, ○, 0.57%; ●, 1.15%; △, 1.71%.  
 B: Release of PE at 17°C, PE content, ○, 0.57%; ●, 1.15%; △, 1.71%. C:  
 Release of PP at 42°C, PP content, ○, 1.30%; ●, 2.59%; △, 3.71%. D:  
 Release of PP at 17°C, PP content, ○, 1.30%; ●, 2.59%; △, 3.71%. E:  
 Release of PB at 42°C, PB content, ○, 1.65%; ●, 4.02%; △, 7.29%. F:  
 Release of PB at 17°C, PB content, ○, 1.65%; ●, 4.02%; △, 7.29%.  
 Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).



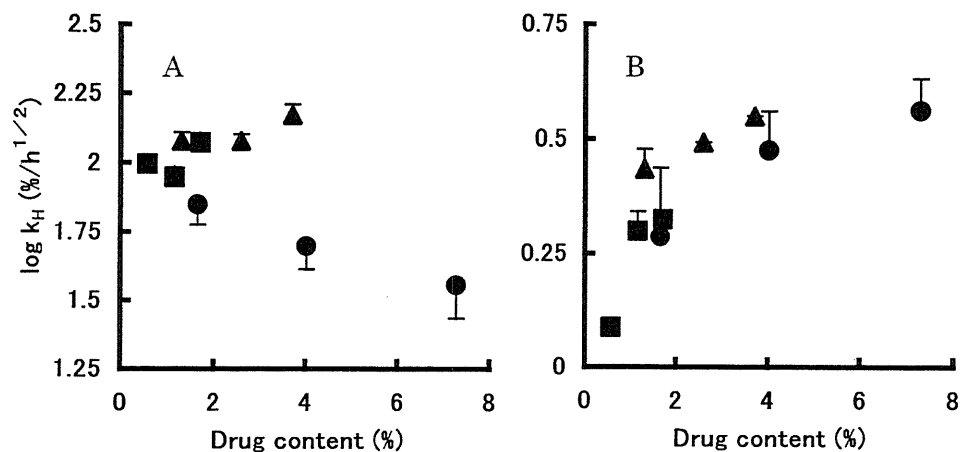


Fig. 24 Effect of Drug Content in PLV-MS on  $k_H$  at 42°C or 17°C  
 A: at 42°C. B: at 17°C. ■, PE; ▲, PP; ●, PB. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).

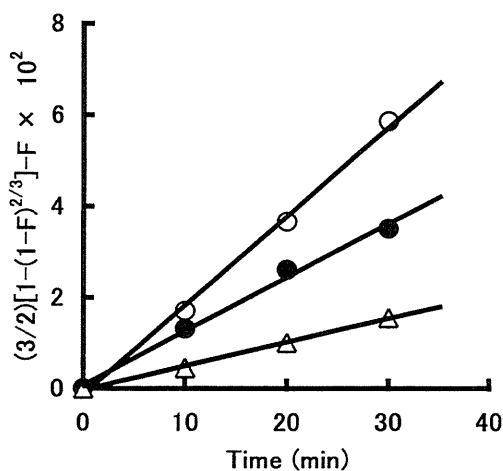


Fig. 25 Relationship between Calculated Values of  $(3/2)[1-(1-F)^{2/3}]-F$  and Time for the PB Release from PLV-MS at 42°C  
 PB content: ○, 1.7%; ●, 3.7%; △, 6.1% .

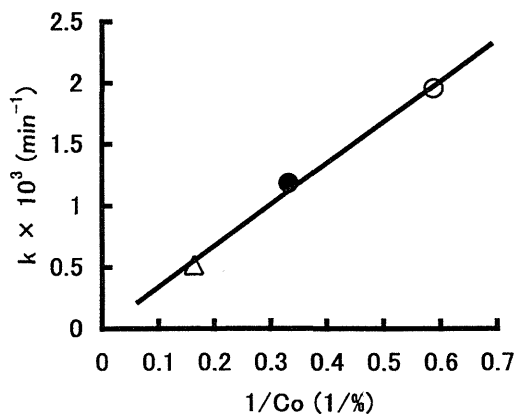


Fig. 26 Relationship between  $k$  and  $1/Co$   
PB content: ○, 1.7%; ●, 3.7%; △, 6.1%.

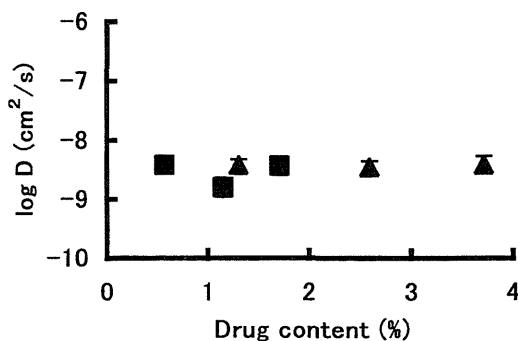


Fig. 27 Effect of Drug Content in PLV-MS on the Diffusion Coefficient ( $D$ ) of the Drugs at 42 °C  
■, PE; ▲, PP. Each value represents the mean ± S.E. (n=3).

次に、 $T_g$  以上の温度での PLV-MS からの薬物放出メカニズムについて、本章第 1 節に示した理論に基づき検討した。Fig. 24A から、42℃の場合、PB 含有 PLV-MS の場合のみ含有率に対する  $k_H$  の減少傾向が見られたため、PB 含有 PLV-MS では式(2)すなわち薬物が懸濁して存在しているマトリックス中の薬物分子の拡散による放出で記述される機構であると仮定した。もしそれが正しければ、式(2)右辺の  $(3DCms/r^2Co)$

は定数であるため、左辺を計算し、時間に対してプロットすれば、直線になることが期待できる。そこで、PB 含有 PLV-MS からの各時間ごとの放出率から式(2)の左辺を計算して時間に対してプロットした(Fig. 25)。その結果、各含有率の PLV-MS において、直線性が示された。さらにその傾き  $3DC_{ms}/r^2C_0$  を式(4)で定義した  $k$  とおき、含有率の逆数に対してプロットした(Fig. 26)。その結果、式(2)により示唆される直線性が示された。これらのことから、PB が PLV-MS 中に懸濁しており、そのマトリックスを形成している高分子中での薬物拡散が律速である放出メカニズムが妥当と考えられる。一方、PE および PP 含有 PLV-MS では、Fig. 24A において、含有率に対し、薬物放出速度の明瞭な依存性が観察されなかったため、PE と PP は PLV-MS 中に完全に溶解していると推察される。そこで、PLV-MS に薬物が完全に溶解しており、そのマトリックスを形成している高分子中での拡散が放出の律速段階である式(1)の適用が妥当であると考え、式(1a)の微分式(1a)'を用い拡散係数  $D$  を求めた。

$$dF/dt = 3(D/r^2\pi t)^{1/2} - 3D/r^2 \quad (1a)'$$

放出実験で得られた放出速度( $dF/dt$ )を  $1/t^{1/2}$  に対しプロットしてその傾きを求めた。その傾きの値は  $3(D/r^2\pi)^{1/2}$  に等しいため、 $r$  に PLV-MS の(メジアン径/2)を代入して、拡散係数  $D$  を得た。求めた  $D$  と薬物含有率の関係を Fig. 27 に示す。PE と PP の  $D$  の値はほぼ等しく、含有率が変化してもほぼ同じ値を示した。

これら一連の結果から、ゴム状態の PLV-MS では薬物はマトリックス中での拡散により制御されており、薬物の親油性の違いにより、PLV 中での溶解状態が異なり、それにより放出の含有量依存性も異なっていると考えられる。

PLA-MS の場合とは異なり、PLV-MS では、 $T_g$  以上の温度における薬物放出の律速がマトリックスを形成する高分子中での拡散であると考えられたので、放出液の性質による影響は少ないものと予想される。そこで、放出液の pH やエステラーゼ添加の影響を PB 含有 PLV-MS について検討した(Fig. 28)。その結果、PLA-MS の場合とは異なり、薬物溶解度を増加させる高い pH 条件下や PB を分解することで薬物の見かけの溶解度を高めるエステラーゼを添加しても、PLV-MS からの PB の放出速度に対する影響はほとんど見られなかった。PLV-MS のこの性質は、MS からの薬物放出の *in vitro-in vivo* 相関を検討していく上で有利であると思われる。

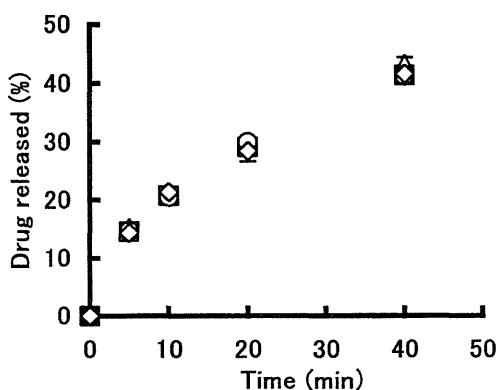


Fig. 28 Effect of Esterase and pH Condition on the Drug Release from PLV-MS Containing PB at 37 °C

□, distilled water; ◇, 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4); △, buffer containing 2.3 units/ml esterase; ○, 0.02 M disodium hydrogenphosphate solution (pH 8.5).

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3). In the case of buffer containing esterase, the percentages of release were calculated from total amount of the drug released (PB plus *p*-hydroxybenzoic acid).

## 第 5 節 L-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体マイクロスフィアからの薬物放出の温度依存性

前節において、 $T_g$  が 25°C の PLV を素材とした PLV-MS は、 $T_g$  以上の温度でゴム状態となることにより、その薬物放出が生体内環境にあまり影響されず、*in vivo* においても安定した放出速度を得られることが示唆された。また、 $T_g$  以下の保存温度では、ガラス状態を呈することから、ゴム状態の MS よりも製剤の安定性に優れているものと予測できる。これらの結果から、さらに、 $T_g$  を挟んだ温度域における PLV-MS からの薬物放出速度の温度依存性について興味を持たれる。

本節では、抗癌剤 FUdR プロドラッグである C4-FUdR を薬物に用い PLV-MS を調製した (Table 12)。その調製に際し、前節までの水中乾燥法の過程に、超音波処理、攪拌速度の高速化、及び有機相の増量を組み合わせることによりメジアン径で 2.83  $\mu$ m まで小さな PLV-MS を得た。前節までで調製した MS の 50  $\mu$ m 以上の粒子径では、その用途が皮下や筋肉内投与による埋め込み剤や動注による塞栓療法に限られるのに対し、小さな粒子径にすることで静脈内や他の脈管内投与から臓器や癌を標的とする

ことも可能である。 <sup>2)</sup>

Table 12    Amount of Drug and PLV Used for Preparation of PLV-MS, Drug Content in PLV-MS, and Median Diameter of PLV-MS

Drug	Amount of drug for preparation (mg)	Amount of PLV for preparation (mg)	Drug content in PLV-MS (%)	Median diameter ( $\mu$ m)
C4-FUdR	10	100	2.04	2.83

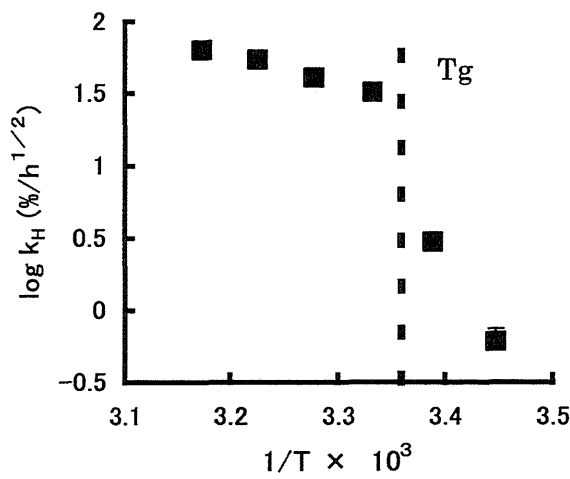


Fig. 29    Effect of Temperature on Drug Release Rate from PLV-MS Containing C4-FUdR

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3).    Interrupted line shows Tg of PLV.

その PLV-MS からの C4-FUdR 放出実験を、各温度(42, 37, 32, 27, 22, 17℃)の放出液中で 6 時間行った。それぞれの温度での薬物放出速度を比較するため、放出実験結果を Linear Higuchi plot し、見かけの放出速度定数( $k_H$ )を求め、 $k_H$ の対数を放出液の絶対温度の逆数に対しプロットした(Fig. 29)。放出液温度の上昇とともに  $k_H$  値の上昇が見られたが、PLV の Tg 付近の温度、すなわち 22℃から 27℃で特に急激

な  $k_H$  の上昇が観察された。この急激な薬物放出速度の上昇は、PLV-MS のガラス状態からゴム状態への相転移によるものと考えられる。この現象から、生体内温度より低く、保存温度より高い  $T_g$  を有する PLV を MS の素材に用いることにより、 $T_g$  以下の温度ではガラス状態で、調製温度、保存温度あるいは投与直前温度で薬物放出を抑え、生体内に投与後、相転移により放出を開始する MS の調製が可能であることを示唆している。また、 $T_g$  が体温以上の高分子を用いて、温熱を加えた部位のみで放出を開始させることが可能な、温熱療法用の MS の調製も可能かもしれない。<sup>57)</sup>

## 第 6 節 小括並びに考察

本章では結晶性の異なる各種高分子を用い調製した MS からの薬物放出機構を、Higuchi, 及び Baker と Lonsdale によりまとめられている放出理論式を用いて検討した。PLA-MS からの薬物放出機構は、薬物が存在するマトリックスに形成された割れ目や穴に、外液が浸入して、その外液に薬物が溶解し、その外液中を拡散して外へ放出されるものと考えられた。その放出速度は、薬物の外液への溶解度にも依存するが、主に薬物含有率に大きく影響を受けることが明らかとなり、含有率を調節することで放出速度を変更できることが示唆された。しかし、酵素等の生体内成分の影響を受けることから、*in vivo* での放出速度を定量的に予測することは困難である。一方、EVA-MS や PLV-MS のゴム状態マトリックスでは、薬物の溶解状態はプロドラッグの物理化学的性質と含有率により決定されるが、いずれの場合でも、放出速度はマトリックスを形成する高分子実質中の薬物拡散により制御されているものと考えられた。それゆえ、PLA-MS とは異なり、PLV-MS からの薬物放出は、外液の組成に影響を受けないことが示された。これらから、結晶性高分子を用いるより、ゴム状高分子を用いることで、*in vivo* において生体の状態の違いによる影響が少ない安定した放出速度が得られ、さらには、*in vitro* から *in vivo* への薬物放出速度の予測が容易となることが期待できる。ゴム状態の高分子では、保存時の製剤の安定性等に問題が生じる可能性がある。PLV は  $T_g$  が体温以下で、PLV-MS からの薬物放出速度は、 $T_g$  以下の温度で低く、 $T_g$  以上の温度にすることで、急激に速まった。このことから、生体内温度より低く、保存温度より高い  $T_g$  を有する非晶性高分子を MS の素材に用いれば、保存時にはガラス状態で、放出が望まれる標的部位の温度においてゴム状態に転移して放出を開始する MS の調製が可能であると思われる。

このように、MS からの薬物の放出機構が用いた高分子と薬物の物性により、全く異なっていることが示された。このことは、薬物と高分子の物理化学的性質と MS からの放出機構ならびに放出速度との関係をより広範囲に調査することの意義を示すとともに、厳密な放出制御を目指すためには、最適な薬物と高分子の選択の重要性を示している。

### 第3章 プロドラッグ含有リピッドマイクロスフィアの調製とリンパ系薬物デリバリーに関する検討<sup>5,8)</sup>

前章までにおいて、MS の調製に高分子を用い、薬物のプロドラッグ化と高分子材料の選択により、MS への薬物取り込み効率の改善と薬物の厳密な放出制御が可能であることを示した。本章では、プロドラッグを MS に含有させることで、薬物を含有したまま目的の場所に効率よく集積する、いわゆるターゲティングの機能を付与した MS について検討を行った。薬物ターゲティングを考えた場合、経口投与により目的部位へ効率よく薬物を送達させることが理想である。癌化学療法においては、癌のリンパ節へのあるいはリンパ系を介した他の組織への転移の予防を目的として、抗癌剤のリンパ系へのターゲティングが有効と考えられている。<sup>2, 5,9)</sup> しかし、抗癌剤の多くは親水性の低分子化合物であり、リンパ系への薬物移行は少ない。そこで、経口投与した後、消化管からリンパ系へ効率的に薬物を送達させるための薬物キャリアーとして、リンパ系を介して吸収されるレシチンや植物油を主成分とする平均粒子径が数十～数百 nm のリピッドマイクロスフィア (LM) が有望であると考えた。LM は静脈内に注射すると、炎症部位や障害血管周辺に集積することは知られているが、経口投与からの薬物キャリアーとしての性質はあまり知られていない。薬物の親油性プロドラッグ化は、それ単独でもリンパ系へのターゲティングに有効であると考えられるが、LM と組み合わせて用いることで、より効率的なターゲティングが可能になると期待できる。

本章では、抗癌剤 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) の糖部水酸基をエステル化したプロドラッグを合成し、その物理化学的性質と酵素反応性を検討した後、プロドラッグ含有 LM を調製した。5'-DFUR は、それ自身が 5-fluorouracil (5-FU) のプロドラッグであり、そのままでは効果を示さないが、腫瘍部位で活性の高いピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼにより 5-FU に変換されるターゲティング効果を有するため、従来のフッ化ピリミジン系抗癌剤より安全性が高く、臨床の間でも経口的に広く使用されている。調製した LM は、5'-DFUR 水溶液や 5'-DFUR 添加 LM をコントロールとして、ラットに経口投与したときの薬物吸収とリンパ移行性について比較検討した。さらに、プロドラッグと LM 各成分の併用効果について検討し、リンパ移行性に影響する要因について考察した。



## 第1節 プロドラッグ含有リピッドマイクロスフィアの調製

LM に含有させる薬物として 5'-DFUR の 2'位, 3'位 OH 基を *n*-デカン酸でアシル化した 2',3'-didecanoyl-5'-DFUR (C10-5'-DFUR)を合成した(Fig. 30). 薬物の物理化学的性質を Table 13 に示す. 5'-DFUR の logP 値がオクタノール, ダイズ油とも 0 より低いのに対し, C10-5'-DFUR のそれは 6 以上と高かった. 薬物の LM の内相であるダイズ油への溶解性を評価した結果, 親水性の 5'-DFUR では 1mg/g より低いのに対し, C10-5'-DFUR では 350mg/g 以上であった.

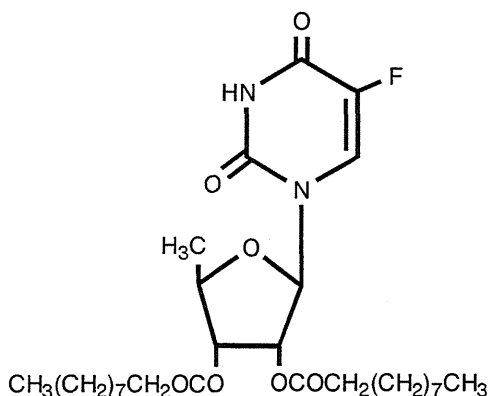


Fig. 30 Structure of C10-5'-DFUR

Table 13 Physicochemical Properties of 5'-DFUR and C10-5'-DFUR

Compound	m. p.	Partition coefficient		Logk <sup>c)</sup>	Solubility in water	Solubility in soybean oil
	(°C)	logP <sup>a)</sup>	logP <sup>b)</sup>		(μg/ml)	(mg/g)
5'-DFUR	191	-3.14	-0.36	0.597	10,000<	1>
C10-5'-DFUR	61	6<	6<	5.766	0.02> <sup>d)</sup>	350<

a) Soybean oil/0.1 M phosphate buffer (pH 6.8). b) *n*-Octanol/0.1 M phosphate buffer (pH 6.8). c) Lipophilic index: The mobile phase was water : acetonitrile system and formamide was used as non-retention substance. d) Not detected.

C10-5'-DFUR からの 5'-DFUR の生成について, ジエステル体からモノエステル体への反応速度定数を  $k_1$ , モノエステル体から 5'-DFUR への反応速度定数を  $k_2$  とし,<sup>60)</sup> それらの値を比較した(Table 14). C10-5'-DFUR の  $k_1$  の値は  $k_2$  と比較して小さく, ジエステル体からモノエステル体への反応が律速段階であることが示された.

C10-5'-DFUR は親油性なので、LM 製剤で投与した場合、安定に油相に保持され、放出した一部の薬物はエステラーゼ存在時には 5'-DFUR に変化し、さらに、ピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼ活性の高い部位において 5-FU を生じると予想される。

Table 14 Enzymatic Hydrolysis Rates of C10-5'-DFUR

Compound	$k_1$	$k_2$
	(n=3, mean±S.E., min <sup>-1</sup> )	
C10-5'-DFUR	0.017±0.002	0.262±0.005

高圧ホモジナイザーで調製した C10-5'-DFUR 含有 LM (C10-5'-DFUR-LM)の製剤中の C10-5'-DFUR 濃度と LM のメジアン径, さらに, 実験期間中の C10-5'-DFUR-LM の安定性の保証を目的として, 5℃で一週間保存した後のそれぞれの値を Table 15 に示す. 別に調製した薬物フリーLM のメジアン径は 225nm で, C10-5'-DFUR を含有させたことによる LM 粒子径への影響は少ないと思われる. また, 一週間保存の後, 薬物含有濃度及び粒子径に変化は認められず, LM 製剤は実験期間中安定であることを確認できた. C10-5'-DFUR の分解物である製剤中 5'-DFUR 濃度を LM 製剤調製直後及び一週間保存後に HPLC により測定した結果, とともに検出限界(0.02 μg/ml)以下であり, クロマトグラム上に分解物のピークは認められなかった.

Table 15 Drug Concentration and Median Diameter of C10-5'-DFUR-LM

Time	Drug concentration	Median diameter of LM
(d)	in o/w emulsion	
	(n=3, mean±S.E., mg/ml)	(n=3, mean±S.E., nm)
0	27.6±0.1	193±12
7	27.6±0.1	208±5

## 第 2 節 ラットを用いた経口投与による薬物吸収性の評価

C10-5'-DFUR-LM, 及び比較を目的として, 5'-DFUR 水溶液(5'-DFUR-W), 5'-DFUR を薬物フリーLM 製剤に添加して調製した LM 製剤(5'-DFUR+LM),

C10-5'-DFUR の水性懸濁液(C10-5'-DFUR-W), C10-5'-DFUR のダイズ油溶液 (C10-5'-DFUR-S), 1.2%レシチンを添加した C10-5'-DFUR 水性懸濁液

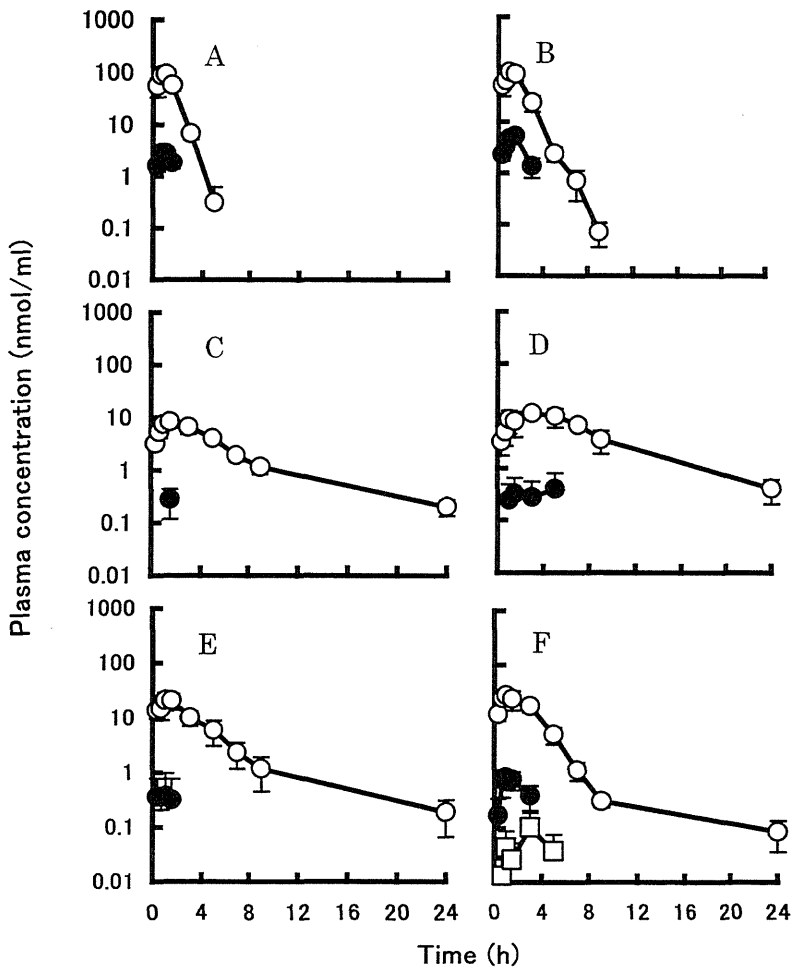


Fig. 31 Plasma Levels of C10-5'-DFUR, 5'-DFUR, and 5-FU after Oral Administration of Various Formulations to Rats at a Dose of 0.406 mmol/kg 5'-DFUR or C10-5'-DFUR

A: 5'-DFUR-W (n=4, 5.0 ml/kg aqueous solution). B: 5'-DFUR+LM (n=3, 8.6 ml/kg o/w emulsion). C: C10-5'-DFUR-W (n=4, 5.0 ml/kg aqueous suspension). D: C10-5'-DFUR-S (n=3, 0.98 ml/kg oil solution). E: C10-5'-DFUR-L (n=3, 6.76 ml/kg aqueous suspension). F: C10-5'-DFUR-LM (n=3, 8.6 ml/kg o/w emulsion). ○, 5'-DFUR concentration; ●, 5-FU concentration; □, C10-5'-DFUR concentration. The volume/kg of C10-5'-DFUR-S and C10-5'-DFUR-L were coincided with the volume/kg of each component in LM. Each value represents the mean±S.E..

Table 16      AUC of Prodrug and Its Metabolizes following Oral  
Administration of Various Formulations to Rats at a Dose  
of 0.406 mmol/kg 5'-DFUR or C10-5'-DFUR

	AUC <sup>C10</sup>	AUC <sup>5'-DFUR</sup>	AUC <sup>5-FU</sup>
	(mean/ml ± S.E., nmolh/ml)		
5'-DFUR-W	—	151.6 ± 15.0	3.1 ± 0.4
5'-DFUR+LM	—	202.2 ± 17.2	10.2 ± 1.6
C10-5'-DFUR-W	— <sup>a)</sup>	49.5 ± 10.8	— <sup>b)</sup>
C10-5'-DFUR-S	— <sup>a)</sup>	99.8 ± 22.0	5.4 ± 5.4
C10-5'-DFUR-L	— <sup>a)</sup>	84.9 ± 33.7	1.4 ± 1.4
C10-5'-DFUR-LM	0.3 ± 0.1	96.2 ± 16.9	2.0 ± 1.1

The linear trapezoidal rule was used to determine AUC from time 0 to the respective last detectable time.    AUC<sup>C10</sup> : AUC of C10-5'-DFUR concentration.    AUC<sup>5'-DFUR</sup> : AUC of 5'-DFUR.    AUC<sup>5-FU</sup> : AUC of 5-FU.    a) Plasma concentration of C10-5'-DFUR was not detected.    b) It was detected just only at 1.5h following administration of C10-5'-DFUR-W, so that the value of AUC could not be calculated.

(C10-5'-DFUR-L)をそれぞれ 0.406 mmol/kg ラットに経口投与した. それぞれの製剤投与後の血漿中薬物濃度時間推移を Fig. 31 に示す. 5'-DFUR を含有する 5'-DFUR-W と 5'-DFUR+LM の投与後は, 類似した 5'-DFUR 血漿中濃度推移を示し, 比較的速い消失が観察された. C10-5'-DFUR の製剤の場合, いずれの製剤においても, 血漿中には大部分 5'-DFUR として出現し, 5'-DFUR 投与製剤と比較して, 5'-DFUR の C<sub>max</sub> は低く, 5'-DFUR 濃度の 24 時間目までの持続が観察された. 各薬物の血漿中薬物濃度時間曲線下面積(AUC)を Table 16 に示す. 5'-DFUR 製剤投与後の AUC は, 水溶液で投与するより LM に添加して投与した方が高くなることが示された. C10-5'-DFUR 製剤投与後の 5'-DFUR の AUC は, 5'-DFUR 製剤に比べて, いずれの C10-5'-DFUR 製剤の場合も低い値となった. C10-5'-DFUR 投与製剤間で比較すると, C10-5'-DFUR を水性懸濁液として投与した場合, 特に 5'-DFUR の AUC の値が低いことが示された. その原因は, C10-5'-DFUR が水にほとんど溶けないため, 吸収の律速段階が溶解過程になったためと考えられた. この結果は, 消化管内でのエステラーゼ活性が C10-5'-DFUR を速やかに 5'-DFUR に変換できるほど高くないことも意味しており, より酵素分解を受け難い C10-5'-DFUR-LM 等での投与では, 5'-DFUR の生成は, 粘膜通過過程やその後に生じていると思われる.

### 第3節 経口投与によるリンパ系への薬物デリバリーの評価

リンパ系への薬物デリバリーを評価するため、胸管リンパにカニューレを施して絶食させたラットに、各製剤を経口投与し、カニューレより24時間持続的にリンパ液を採取した。リンパ液中 C10-5'-DFUR, 5'-DFUR, 及び 5-FU 濃度は、HPLC により測定した。ただし、モノエステル体濃度については、採取したリンパ液をエステラーゼ処理し、C10-5'-DFUR とそのモノエステル体を全て 5'-DFUR に変換後 5'-DFUR 濃度を測定し、その薬物濃度と個別に測定した C10-5'-DFUR と 5'-DFUR 濃度の和との差をモノエステル体濃度と考えた。それぞれの製剤のリンパ液に回収される総薬物量の時間推移を Fig. 32 に示す。また、Table 17 に24時間にリンパ液中に回収された C10-5'-DFUR, C10-5'-DFUR モノエステル体, 5'-DFUR, 5-FU の各薬物量及びその総量を示す。C10-5'-DFUR 製剤投与時、血漿中にはほとんど 5'-DFUR として検出されたのに対して、リンパ液中には、未変化体である C10-5'-DFUR が出現し、C10-5'-DFUR が一部分解したモノエステル体もわずかに存在した。

5'-DFUR-W と 5'-DFUR+LM 投与後のリンパ液中総薬物移行量には、差は見られなかった。一方、C10-5'-DFUR をカイロミクロン原料であるダイズ油やレシチンと共に投与することにより、リンパ系への薬物送達が高まることが示された。ダイズ油やレシチンを経口投与した場合、リパーゼにより胆汁酸塩との複合ミセルに変化して微絨毛間に入り込み腸管上皮細胞に取込まれた後に、カイロミクロンを形成してリンパ管に移行する。<sup>61, 62)</sup> Stella らのグループは、難吸収性薬物とカイロミクロンの原料である植物油の併用投与でカイロミクロン形成を促進させることにより、難吸収性薬物のリンパ系を介した生体内への吸収を改善できると報告している。<sup>63-65)</sup> 彼らは、これら報告の中で、分配係数  $\log P$  (n-octanol/water) が5より大きく、植物油に良く溶ける薬物がカイロミクロンへの分配に有利であると結論している。本章の結果でも、24時間までのリンパ液採取量は、水溶液投与よりカイロミクロン原料投与の方が多くなる傾向がみられ、カイロミクロン形成の促進によりリンパ流量が増加したと考えられた (Table 18)。また、親水性の 5'-DFUR では、LM に添加しての投与でもリンパ系移行が低いのにに対し、 $\log P$  が5より大きくダイズ油に良く溶ける C10-5'-DFUR では、ダイズ油やレシチンとの併用時に高いリンパ移行が得られ、カイロミクロンの形成促進に加えて薬物のカイロミクロンへの分配がリンパ移行性において重要であることが示された。

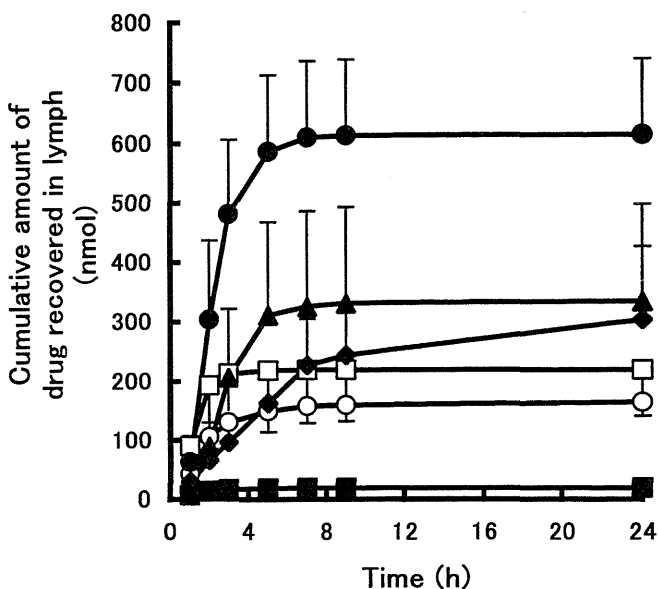


Fig. 32 Cumulative Lymphatic Transport of Total Drug after Oral Administration of Various Formulations to Rats at a Dose of 0.406 mmol/kg 5'-DFUR or C10-5'-DFUR

□, 5'-DFUR-W (n=4, 5 ml/kg aqueous solution); ○, 5'-DFUR+LM (n=3, 8.6 ml/kg o/w emulsion); ■, C10-5'-DFUR-W (n=3, 5 ml/kg aqueous suspension); ▲, C10-5'-DFUR-S (n=4, 0.98 ml/kg oil solution); ◆, C10-5'-DFUR-L (n=3, 6.76 ml/kg aqueous suspension); ●, C10-5'-DFUR-LM (n=3, 8.6 ml/kg o/w emulsion). The volume/kg of C10-5'-DFUR-S and C10-5'-DFUR-L were coincided with the volume/kg of each component in LM. Each value represents the mean  $\pm$  S.E..

Table 17 Cumulative Lymphatic Transport of Prodrug, Its Metabolizes, and Total Drug (0-24hr) after Oral Administration of Various Formulations to Rats at a Dose of 0.406 mmol/kg 5'-DFUR or C10-5'-DFUR

	Diesters	Monoester	5'-DFUR (mean $\pm$ S.E., nmol)	5-FU	Total drug
5'-DFUR-W	—	—	209.8 $\pm$ 58.6	9.3 $\pm$ 1.8	219.1 $\pm$ 60.3
5'-DFUR+LM	—	—	152.2 $\pm$ 21.2	11.8 $\pm$ 1.9	164.0 $\pm$ 22.9
C10-5'-DFUR-W	0.2 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.6	18.4 $\pm$ 3.7	0.5 $\pm$ 0.3	18.9 $\pm$ 3.6
C10-5'-DFUR-S	127.6 $\pm$ 84.4	6.2 $\pm$ 6.5	197.4 $\pm$ 78.4	3.5 $\pm$ 1.4	334.9 $\pm$ 163.2
C10-5'-DFUR-L	55.1 $\pm$ 38.7	9.8 $\pm$ 7.2	228.0 $\pm$ 73.4	10.9 $\pm$ 4.3	303.8 $\pm$ 123.0
C10-5'-DFUR-LM	237.6 $\pm$ 76.7	53.7 $\pm$ 5.0	317.0 $\pm$ 28.5	6.7 $\pm$ 3.2	615.0 $\pm$ 125.8

Table 18 Total Lymph Output (0-24hr) after  
Oral Administration of Various  
Formulations to Rats at a Dose of  
0.406 mmol/kg 5'-DFUR or  
C10-5'-DFUR

	Total lymph output (mean±S.E., ml)
5'-DFUR-W	13.6±2.4
5'-DFUR+LM	14.2±1.0
C10-5'-DFUR-W	13.8±1.0
C10-5'-DFUR-S	14.8±1.1
C10-5'-DFUR-L	14.8±2.2
C10-5'-DFUR-LM	14.9±0.7

C10-5'-DFUR-LM 投与後のリンパ液中総薬物移行量は、他の製剤のそれと比較して極端に高くなり、薬物のリンパ系送達には、プロドラッグを LM に含有させることが有用であることが示された。C10-5'-DFUR-LM 投与では、リンパ液中 C10-5'-DFUR 回収量が特に高いことが特徴的である。これは、LM に含有させ投与することで消化管管腔での薬物放出や C10-5'-DFUR の加水分解を受け難く、効率的にリンパに移行したためと考えられる。今後、更なる検討は必要であるが、もし、LM がこのような代謝から薬物を保護する作用を有するなら、腸管組織中での 5-FU への代謝を防ぐことにより、消化管への副作用が軽減できるかもしれない。

#### 第 4 節 小括並びに考察

抗癌剤のプロドラッグを液状のリピッドマイクロスフィアに含有させることにより、経口投与による薬物のリンパ系デリバリーを試みた。5'-DFUR の糖部水酸基を *n*-デカン酸でアシル化した 5'-DFUR プロドラッグは高い親油性を示した。そのプロドラッグを含有させ調製したマイクロスフィアは、200nm 程度の粒子径を示した。

5'-DFUR を水溶液として、あるいは LM 製剤に添加して投与した場合、血漿中 5'-DFUR 濃度は速やかに消失したが、C10-5'-DFUR 製剤の投与の場合、血漿中の C10-5'-DFUR はほとんど検出されなかったものの、全ての製剤で 24 時間までの血漿

中 5'-DFUR 濃度の持続が観察された。リンパ系には C10-5'-DFUR が検出されていることから、少なくとも一部は C10-5'-DFUR として吸収されていると考えられるので、この血漿中 5'-DFUR 濃度の持続は、親油性プロドラッグである C10-5'-DFUR が吸収された後、リンパ系や細胞膜等の脂溶性部分に分布し、それから徐々に 5'-DFUR を生じたことによると思われる。5'-DFUR を含めた 5-FU 系の代謝拮抗薬は、時間依存的な作用機序を有することから、この血漿中濃度の持続は薬効の面で有利に働くかもしれない。

リンパ系への薬物送達を評価した結果、C10-5'-DFUR をカイロミクロン原料であるダイズ油やレシチンと共に投与することにより、リンパ系への薬物送達が高まることが示されたが、C10-5'-DFUR を LM に含有させて投与した場合、リンパ系への薬物デリバリーが最もすぐれており、薬物のリンパ系送達には、プロドラッグを LM に含有させて投与する方法が有用であることが示された。C10-5'-DFUR-LM 投与では、リンパ液中 C10-5'-DFUR 回収量が特に高いことが特徴的であり、レシチンやダイズ油が消化されて吸収されるのに対し、LM は平均粒子径 200nm 程度の安定なエマルジョン微粒子であり (Table 15)、一部はパイエル板や細胞間隙を通り、直接吸収されることも考えられ、<sup>66-68)</sup> その効果により、効率的にリンパに移行したと考えられる。

本章において、5'-DFUR の親油性プロドラッグを合成し、LM に含有させてラットに経口投与した。プロドラッグ含有 LM の投与により、血漿中濃度の長時間の持続と薬物の高いリンパ系送達を得ることに成功した。さらなる検討は必要であるが 5'-DFUR のリンパ系送達を高めたこの投与法は、癌の転移予防やリンパ系が関わる癌の治療に、有効性を発揮するものと期待される。



## 結論

現在、薬物のターゲティングを目的とした微粒子キャリアを用いた技術に関して多くの検討がなされており、種々薬物で、薬効の増強や、副作用の軽減が報告されている。すでにパルミチン酸デキサメタゾンやプロスタグランジン E<sub>1</sub> を含有させたりピッドマイクロスフィアは商品化され、アムホテリシン B 含有リボソームについても臨床試験段階にある。今後も、様々な薬物について、種々機能を有する素材を用いて調製された微粒子キャリアが DDS 製剤として開発されていくに違いない。このような状況の下、著者は、薬物と微粒子キャリア素材の物性と両者を組み合わせて得られる製剤の特性の関係を明確化することは、より優れた製剤を開発する上で必要不可欠と考えた。

本研究においては、薬物をプロドラッグ化することによる薬物の物理化学的性質の積極的な変更と、種々物性を有するマイクロスフィア素材の適切な選択により、微粒子キャリアが持つべき 3 つの性質、すなわち効率的かつ安定に薬物を保持し、目的とする部位に効率よく移行し、そしてそこで理想的な速度で薬物を放出する特性を有する MS の調製が可能であることを示した。その結果を以下に要約した。

1. 水溶性の抗癌剤を親油性のプロドラッグにすることにより、親油性の生体内分解性高分子で調製したマイクロスフィアの中に抗癌剤が効率的に保持され、抗癌剤の生体内での徐放化により、抗癌剤の効力を高めることが可能であることを示すとともに、その製剤設計における問題点を明らかにすることを目的として検討を行った。FUdR の糖部 3',5' 位水酸基を種々直鎖飽和脂肪酸でアシル化した FUdR ジエステルプロドラッグは、広範囲な物理化学的性質を示した。水中乾燥法で調製した PLA-MS や PHB-MS へのプロドラッグの取り込みは、プロドラッグのアシル基を長くし、親油性にすることにより改善された。In vitro において、PLA-MS からの C4-FUdR, C5-FUdR, C6-FUdR や PHB-MS からの C5-FUdR の放出は、適度に徐放化され、in vivo においても高い抗腫瘍効果を示し、この投与方法が有効であることが示された。しかし、in vitro における生体内成分を含んだ条件での放出実験の結果、特に高い効果を示した C6-FUdR 含有 PLA-MS からの薬物放出速度が生体内成分濃度依存的に速くなることが明らかとなった。この問題は、in vivo において最適な放出速度になるよう製剤を設計する上で障壁となると考えられるが、その原因の究明と改善策には放出メカニズム

の理解が必要であると考えた。

2. *In vivo* において最適な放出速度を示す製剤を設計するための基礎検討として、種々物性の異なる高分子マイクロスフィアからの種々物性の異なる薬物の放出メカニズムを明らかにし、両者の物性と放出メカニズムの関係の解明を試みた。その結果、結晶性高分子である PLA で調製した PLA-MS からの薬物放出メカニズムは、薬物が存在するマトリックスに形成された割れ目や穴に外液が浸入して、その外液に薬物が溶解し、その外液中を薬物が拡散して外へ放出されるものと考えられた。また、その放出速度は主に薬物含有率に影響を受けることが明らかとなり、含有率を調節することで放出速度を変更できること、およびその処方設計の自由度においても親油性の薬物が有利であることが示された。一方、EVA や PLV で調製したゴム状態のマイクロスフィアからの薬物放出メカニズムは、両者ともマトリックスを形成する高分子実質中の薬物拡散によるものであると考えられ、薬物のマトリックス中の溶解状態は薬物および高分子の親油性と含有率により決定することが示された。PLV-MS からの薬物放出の律速段階は、PLA-MS とは異なりマトリックス実質中の拡散であるので、外液の組成に影響を受けないことが併せて示された。この結果から、*in vivo* においても計画された放出速度が得られるように製剤を設計するためには、結晶性高分子よりゴム状態を呈する高分子を用いる方が有利であると考えられる。ゴム状態では保存時の製剤の安定性などに問題が生じる可能性があるので、保存時はガラス状態で、放出が望まれる標的部位の温度においてゴム状態を呈する PLV のような高分子材料が放出制御の面では理想的であると思われる。

3. マイクロスフィアによる標的指向化の一例として、抗癌剤のプロドラッグを液状の LM に含有させることによる経口投与後の薬物のリンパ系デリバリーを試みた。5'-DFUR の糖部 2',3'位水酸基を *n*-デカン酸でアシル化した C10-5'-DFUR は高い親油性を示した。そのプロドラッグを含有させて調製した LM は、200nm 程度の粒子径を示した。プロドラッグ含有 LM、プロドラッグ懸濁液、5'-DFUR 水溶液、5'-DFUR 添加 LM をそれぞれラットに経口投与し、投与後の血漿中薬物濃度と薬物のリンパ移行量を測定した。その結果、5'-DFUR 投与後の血漿中 5'-DFUR は速やかに消失したが、プロドラッグの投与で、血漿中 5'-DFUR 濃度の持続が観察された。プロドラッグ含有 LM 投与後の薬物リンパ系移行性は特に高く、この投与方法がリンパ系へのターゲティングに関して有用であることが示された。この効果は、LM がカイロミクロンの原

料から形成されていること、および LM 微粒子の一部がプロドラッグを封入したまま消化管膜を通過して直接リンパ管に移行すること、そして脂溶性のプロドラッグがそれと運命を共にすることが関係すると考えられた。

上述した本研究における研究結果は、微粒子キャリアを開発する上で素材と薬物の物性の関係が重要で、それら物性やそれにより得られる特性を把握して利用することが優れた微粒子キャリアの開発において必要であることを示している。今後益々活発に開発される微粒子キャリアの設計に本研究結果がいささかの知見を与えられればと考える。

## 謝辞

本研究に際し、研究テーマの決定から結論に至るまで終始御懇篤なる御指導を賜りました城西大学薬学部、從二和彦教授に深く感謝いたします。

実験にご協力いただき終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました関俊暢助手に深く感謝いたします。

実験に際し、示唆に富んだ御教示並びに御指導を賜りました川口健夫講師に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり有益な御助言並びに御激励を賜りました森本雍憲教授に厚く御礼申し上げます。

本論文作成にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました鮫島啓二郎教授並びに杉林堅次教授に深謝いたします。

また、実験の一部に御力添えいただいた熊本大学医学部付属病院薬剤部部長、中野眞汎教授、神戸学院大学薬学部、福島昭二講師に深謝いたします。

また、本研究の機会を与えてくださいました日研化学株式会社、常務取締役、鈴木衛士氏、大宮研究所長、佐々木義幸氏に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり有益な御指導、御助言をいただいた日研化学株式会社、大宮研究所、藤田幸正主席研究員、落合満主管研究員、奥村睦男主管研究員、真岡工場、浮ヶ谷正次長に深く感謝いたします。また、実験に御協力いただいた城西大学薬学部、長谷川哲也助手、薬剤学教室、石川耕三修士、萩田泰生修士、羽入博美氏、丸和代氏、斉藤晃子氏、遠藤久美子氏、並びに教室関係諸氏、日研化学株式会社、大宮研究所、大森裕正主任、熊倉克頼研究員並びに研究員諸氏に感謝いたします。

## 実験の部

### 第1章 実験の部

#### (1) 材料

FUdR は、ヤマサ醤油(株)より提供された。アルカリ処理ゼラチンは、新田ゼラチン(株)より、ポリ L-乳酸(PLA, PLA-6K, MW: 6,000)は三井東圧化学(株)よりそれぞれ提供された。ブタ肝エステラーゼ懸濁液(3.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 2,600 units/ml)は、シグマ社より購入した。懸濁液は、0.1M リン酸塩緩衝液(pH 7.4)で希釈し、200units/ml とした。その液をメンブランフィルター(0.45  $\mu$ m)で濾過し、濾液は 5℃以下で冷蔵保存した。この液は、調製後、50 時間までのものを用いた。牛血清アルブミンは、和光純薬(株)より購入した。その他の試薬は、市販特級品を購入し、そのまま用いた。

#### (2) 3',5'-Diacyl-FUdR (C<sub>n</sub>-FUdR: diaetyl (n=2)~didodecanoyl (n=12))の合成法

C2-FUdR~C12-FUdR (Table 1)は、Nishizawa 等の方法<sup>4,7)</sup>に従い以下のように合成した。各 2g の FUdR を少量の 4-メチルアミノピリジンとともにピリジン(20ml)に溶解させた溶液に、それぞれの酸無水物(メタン酸~*n*-ドデカン酸)を 2.5 倍当量加え、室温で終夜反応させた。反応液は、減圧下でピリジンを留去し、残渣にジクロロメタン(10ml)を加えて溶解させた。その溶液を 0.1N 塩酸および炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、減圧下ジクロロメタンを留去した。得られた組成物は、ジクロロメタンを移動相にシリカゲルカラムにより分離、精製した。

#### (3) 薬物の融点測定法

薬物の融点は、融点測定器(MPS-3, 柳本)により測定した。

#### (4) 薬物の分配係数の測定法

FUdR および C<sub>n</sub>-FUdR の見かけの分配係数は、*n*-オクタノール/0.1M リン酸塩緩衝液(pH7.0)系で測定した。C2-FUdR から C6-FUdR の場合、少量の *n*-オクタノール(0.5~1.0ml)に薬物(10~50mg)を溶解し、緩衝液(45ml)を加え、室温で薬物を分配させ、水層中の薬物濃度は、分光光度計を用い 268nm の吸光度で測定した。C8-FUdR

の場合は、上記方法により薬物を分配させた後、水層中の薬物濃度を濃縮するために、以下の操作を行った。水層から 40ml の緩衝液を分取し、クロロホルム(2ml)で抽出した。そのクロロホルムを N<sub>2</sub> ガスで留去後、残査をメタノール(1ml)に溶解させ、薬物濃度を HPLC で測定した。

FUdR の場合、緩衝液(1ml)に FUdR (20mg)を溶解し、*n*-オクタノール(10ml)を加え分配させた後、有機層から 5ml を分取し、分取液より精製水(2ml)で 6 回薬物を抽出した。その抽出液中薬物濃度を HPLC で測定した。

分配係数は、有機層中の薬物濃度を水層中薬物濃度で割ることにより計算した。

#### (5) 薬物の溶解度測定法

C2-FUdR～C6-FUdR をそれぞれ精製水に懸濁させ、水平振とう器(37℃)中で振とうした。薬物濃度が平衡に達した後、遠心分離し、その上澄をメンブランフィルター(0.45 μm)で濾過した。この溶液中薬物濃度を HPLC により測定した。親油性の高い C8-FUdR, C10-FUdR については、多量の薬物飽和溶液により薬物吸着を飽和させた実験器具を用いた。飽和溶液中薬物濃度を濃縮するために、クロロホルムにより抽出し、N<sub>2</sub> ガスでクロロホルムを留去後、残査をメタノールに溶解させ、薬物濃度を HPLC により測定した。

#### (6) PLA-MS 及び PHB-MS の調製法

PLA-MS 及び PHB-MS は、Wakiyama 等の方法<sup>6)</sup>に従い以下に記した水中乾燥法により調製した。PLA あるいは PHB (100mg)と C<sub>n</sub>-FUdR (PLA-MS の場合 20mg, PHB-MS の場合 30mg)をジクロロメタン(2ml)に溶解した。また、ジクロロメタンに溶解しない FUdR はジクロロメタン中でソニケーターにより分散させた。これらジクロロメタン溶液あるいは懸濁液を、プロペラ式攪拌器(MDC スターラ, 東京理科機械(株))により 500rpm で攪拌させた 100ml ビーカー中の 1%ゼラチン溶液(90ml)に注入し、35 分後、G4 ガラスフィルターで濾取した。精製水で洗浄後、18 時間減圧乾燥し PLA-MS あるいは PHB-MS を得た。

#### (7) MS 中薬物含有率の測定法

MS 中 C<sub>n</sub>-FUdR の含有率(drug/MS, (w/w)%)は、MS をクロロホルムに溶解させ、

その溶液中の薬物濃度を分光光度計を用い 268nm の吸光度で測定し算出した。クロロホルムに溶けない FUdR については、クロロホルムに MS を溶解後、精製水で FUdR を抽出し、その水溶液中の薬物濃度を分光光度計を用い 268nm の吸光度で測定し算出した。

#### (8) MS の粒子径測定

粒子径は、適当量の MS をスライドガラス上にのせ、少量の精製水を加えてカバーガラスで固定し、光学顕微鏡(BH-2, オリンパス光学工業株)下、無作為に MS, 100 個のグリーン径を測定し、算術平均値を求めた。

#### (9) *In vitro* における MS からの薬物放出実験法

比較的溶解度の高い Cn-FUdR を含有する MS からの薬物放出実験は、放出液に 0.01% Tween 80 含有生理食塩液を用いた。精密に秤量したそれぞれの MS を三角フラスコに入れ、放出液を加えた。そのフラスコを水平振とう器(37℃)中で振とうさせ、経時的にサンプリングした。サンプリングでは、放出液中のシンク条件(薬物の飽和溶解度の 10%以下の濃度)を保つために、適当量の放出液を分取し、適当量の新しい放出液を加えた。サンプル中薬物濃度は、分光光度計を用い 268nm の吸光度で測定した。

#### (10) エステラーゼを含有する試験液への PLA-MS の薬物放出実験方法

C4-FUdR~C12-FUdR 含有 PLA-MS について、放出液にブタ肝エステラーゼを含有する 0.1M リン酸塩緩衝液を用い、(9)と同様の方法で放出実験を行った。サンプル中薬物濃度(FUdR とプロドラッグ濃度)は、HPLC により測定した。なお、エステラーゼを含有する放出液は、実験開始後 24 時間毎に新しい放出液に全量交換した。

#### (11) アルブミンを含有する試験液への PLA-MS からの薬物放出実験法

C4-FUdR~C6-FUdR 含有 PLA-MS について、牛血清アルブミンを含有する 0.1M リン酸塩緩衝液を用い、(9)と同様の方法で放出実験を行った。サンプル中薬物濃度は、HPLC により測定した。

## (12) HPLC を用いた薬物定量法

絶対検量線法を用い薬物の定量を行った。以下にその測定条件を示す。

- ・機種：LC-6A, SPD-6A (島津製作所株)
- ・カラム：Nucleosil C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150mm)
- ・検出波長：270nm
- ・流速：1.0ml/min
- ・注入量：20  $\mu$ l

Table 19 Mobile Phase for HPLC

Compound	buffer <sup>a)</sup> : methanol
C2-FUdR	70 : 30
C3-FUdR	50 : 50
C4-FUdR	30 : 70
C5-FUdR	20 : 80
C6-FUdR	15 : 85
C8-FUdR	10 : 90
C10-FUdR	5 : 95
C12-FUdR	2 : 98
FUdR	95 : 5 : 0.1 <sup>b)</sup>

a) 0.02 M Acetate buffer (pH 4.0). b) Water : acetonitrile : acetic acid.

## (13) *In vivo* マウス P388 白血病細胞に対する抗腫瘍効果測定法

実験動物には、静岡実験動物より購入した4週令の雌性CDF<sub>1</sub>マウス(20~23g)を用いた。購入したマウスを馴化させるため、4~6週間飼育した後、8~10週令のマウスを実験に用いた。10<sup>6</sup>個のP388白血病細胞をマウス(1群5匹)腹腔内に移植し、24時間後、腹腔内にFUdR溶液、Cn-FUdR懸濁液、あるいはMS懸濁液を投与した。FUdR溶液とCn-FUdR懸濁液の場合は、1回投与と1日1回5連投した。MS懸濁液の場合は、1回投与のみ行った。抗腫瘍効果は、無処置群(control)に対する処置群(treatment)の延命日数の比(T/C, %)で評価した。癌細胞をマウスに移植した日(0日目)と5日後に測定した体重変化を副作用の指標とした。



## 第2章 実験の部

### (1) 材料

FUdR, Cn-FUdR, PLA, ブタ肝エステラーゼ及びアルカリ処理ゼラチンは、実験の部第1章(1, 2)と同様である。 *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル, プロピル, ブチルエステル(PE, PP, PB)は、東京化成工業(株)から購入した。エチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA, EVAFLEX® 260, 酢酸ビニル 28%含有)は三井デュポンポリケミカル(株)から供与された。L-乳酸- $\delta$ -バレロラクトン共重合体(PLV, L-乳酸: $\delta$ -バレロラクトン=90:10 mol%, MW 11,500, Tg=25°C)は、多木化学(株)から購入した。他の試薬は、市販特級品を購入し、そのまま用いた。

### (2) 薬物の分配係数測定法

PE, PP, および PB の見かけの分配係数は、ジクロロメタン/水系で測定した。各薬物をジクロロメタン(4ml)に溶解し、精製水(4ml)を加え室温で10分間混液を振とうした後、4°C下48時間放置した。水層中の薬物濃度は、HPLCを用い測定した。

### (3) PLA-MS, EVA-MS, 及び PLV-MS の調製法

FUdR あるいは C3-FUdR~C6-FUdR を含有させた PLA-MS 及び C3-FUdR~C6-FUdR を含有させた EVA-MS は、実験の部第1章(6)と同様の方法で調製した。調製時に PLA あるいは EVA (100mg)に添加した薬物量は、それぞれ Table 8 と Table 9 に示す。

PLV-MS の調製は4°C以下の条件下で行った。PE, PP あるいは PB 含有 PLV-MS の場合の調製において、PLV (100mg)に添加した各 PE, PP 及び PB 量を Table 11 に示す。高分子(100mg)とそれぞれの薬物をジクロロメタン(2ml)に溶解し、これらジクロロメタン溶液を、4°Cの下、プロペラ式攪拌器により 500rpm で攪拌させた 100ml ビーカー中の 1.5%ポリビニルアルコール溶液(90ml)に注入し、3時間攪拌後、冷水で洗浄し、凍結乾燥させて PLV-MS を得た。

C4-FUdR 含有 PLV-MS の場合、PLV (100mg)と C4-FUdR (10mg)をジクロロメタン(4ml)に溶解し、このジクロロメタン溶液を氷冷下超音波処理(150W)を受けている 200ml ビーカー中の 1.5%ポリビニルアルコール水溶液(90ml)中に注入した。3分間超

音波処理後、4℃に保ったまま 2000rpm で 6 時間攪拌した。攪拌後、冷水により洗浄し、凍結乾燥させて PLV-MS を得た。

#### (4) MS 中薬物含有率の測定法

MS 中の薬物含有率は実験の部第 1 章(7)と同様の方法により分光光度計を用い測定した。なお、PE、PP、PB の濃度は、253nm の吸光度により測定した。

#### (5) MS の粒子径測定法

PLA-MS 及び EVA-MS の粒子径は実験の部第 1 章(8)と同様の方法により測定した。PLV-MS の場合は、PLV-MS を精製水に分散後、レーザー回折式粒度分布測定装置 (SALD-1,100, 島津)により、粒度分布を測定し、メジアン径を求めた。

#### (6) *In vitro* における PLA-MS からの薬物放出実験法

種々の PLA-MS の粒子径を等しくするために、篩過法により 120-mesh のふるいを通過し 150-mesh のふるい上に残る粒子径の PLA-MS を実験に用いた。以下、実験の部第 1 章(9)と同様の方法により放出実験を行った。サンプル中の薬物濃度は、HPLC を用い、実験の部第 1 章(12)と同様の条件により測定した。

#### (7) *In vitro* における EVA-MS からの薬物放出実験法

実験の部第 1 章(9)と同様の方法により放出実験を行った。サンプル中の薬物濃度は、分光光度計を用い 268nm の吸光度で測定した。

#### (8) 薬物の EVA 膜透過実験法

EVA 膜は、100℃、500kg/cm<sup>2</sup>で 5 分間加圧することにより厚さ約 0.2mm に調製した。厚さを測定した EVA 膜を片側セルの容積が 2.3ml で有効拡散面積が 0.95cm<sup>2</sup> の 2 チャンバー拡散セルに挟み、片側に C3-FUdR、C4-FUdR もしくは C5-FUdR の精製水で調製した懸濁液を、反対側に精製水を加えて 37℃に保った。C6-FUdR に関しては、溶解度が低く、シンク条件の維持が困難だったため実験を行わなかった。

膜を透過した薬物濃度は HPLC を用い、実験の部第 1 章(12)と同様の条件により測定した。

#### (9) C5-FUdR 含有 EVA 球形マトリックスの調製法

直径が 0.13cm で C5-FUdR を溶解度以下の濃度で含有する EVA の球形マトリックスを水中乾燥法で調製した。EVA (100mg)と C5-FUdR (7mg)をジクロロメタン(1ml)に溶解し、300rpm で攪拌した 1%ゼラチン水溶液(90ml)中に分散した。攪拌時間は室温で 45 分間とし、他の条件は実験の部第 1 章(6)と同様である。

#### (10) *In vitro* における EVA 球形マトリックスからの C5-FUdR 放出実験法

一粒の EVA 球形マトリックスの重量と粒子径を測定した後、生理食塩液を入れた試験管に投入した。その試験管を 37℃に保ち振とうし、経時的に放出液を全量交換した。放出液中の薬物濃度は、分光光度計を用い 268nm の吸光度で測定した。

#### (11) *In vitro* における PLV-MS からの PE, PP, あるいは PB 放出実験法

PLV の T<sub>g</sub> 以上の温度で、薬物放出速度を評価するため、42℃で放出液に精製水を用い、実験の部第 1 章 (9)と同様の方法により放出実験を行った。放出液中の薬物濃度は、HPLC により測定した。比較のため 17℃での放出実験も同様に行った。

#### (12) PLV-MS の薬物放出におよぼす pH とエステラーゼの影響を評価するための方法

PB 含有 PLV-MS からの薬物放出実験は、37℃で実験の部第 1 章 (9)と同様の方法により行った。放出液には、精製水、0.1M リン酸塩緩衝液(pH7.4), 0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液(pH8.5), 及び 2.3 units/ml ブタ肝エステラーゼを含有する 0.1M リン酸塩緩衝液を用いた。放出液中の薬物濃度は、HPLC により測定した。

#### (13) PLV-MS からの C4-FUdR 放出におよぼす温度の影響を評価するための方法

PLV-MS からの C4-FUdR 放出におよぼす温度の影響を評価するために、各温度(42, 37, 32, 27, 22, 17℃)で放出液に精製水を用い、実験の部第 1 章(9)と同様の方法により実験を行った。放出液中の C4-FUdR 濃度は第 1 章(12)と同様 HPLC により測定した。

#### (14) 見かけの放出速度定数(k<sub>H</sub>)の算出方法

各 MS からの薬物放出プロファイルから見かけの放出速度定数( $k_H$ )を, Aso 等の方法<sup>5,4)</sup>に従って求めた. すなわち, 時間の平方根に対し薬物放出率をプロットした Linear Higuchi plot とし, その直線の傾きから  $k_H$  を求めた.

#### (15) HPLC を用いたパラベン類の定量法

絶対検量線法を用い薬物の定量を行った. 以下にその測定条件を示す.

- ・ 機種 : LC-3A, SPD-2A (島津製作所株)
- ・ カラム : LiChrospherRP 18e ( $5\mu\text{m}$ ,  $4.0\times 250\text{mm}$ , メルク)
- ・ 検出波長 :  $253\text{nm}$
- ・ 流速 :  $1.0\text{ml/min}$
- ・ 注入量 :  $20\mu\text{l}$

Table 20 Mobile Phase for HPLC

Compound	water : acetonitrile
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	85 <sup>a)</sup> : 15
PE	60 : 40
PP	50 : 50
PB	40 : 60

a) 0.1% Phosphoric acid.

### 第 3 章 実験の部

#### (1) 材料

精製卵黄レシチン(PL100E)は, キューピー(株)より供与されたものを用いた. 5'-Deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR)はシグマ社より購入した. ブタ肝エステラーゼ (エステラーゼ懸濁液,  $2,530\text{ units/ml}$ )は, シグマ社より購入した. エステラーゼ懸濁液は,  $0.1\text{ M}$  リン酸塩緩衝液( $\text{pH } 7.4$ )で希釈し, 実験の部第 1 章(1)と同様の方法によりエステラーゼ溶液( $200\text{ units/ml}$ )を調製及び保存した. 他の試薬は市販特級品を購入し, そのまま用いた.

#### (2) 2',3'-Didecanoyl-5'-DFUR (C10-5'-DFUR)の合成法

C10-5'-DFUR は Nishizawa 等の方法<sup>4,7)</sup>により合成した。すなわち、5'-DFUR (1g) をピリジンに溶解させ、0℃下、*n*-デカン酸クロリドを 3 倍等量滴下し、室温で 2 時間放置した。*n*-デカン酸クロリドを分解するため、0℃下、メタノールを加え、室温で 1 時間攪拌した。酢酸エチルを加え、10%塩酸及び炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、溶媒を減圧下で留去し、得られた組成物を *n*-ヘキサン：酢酸エチル(8:1)を移動相にしリカゲルカラムにより、分離、精製し、C10-5'-DFUR を得た。化学構造は、<sup>1</sup>H-NMR と MS により確認した。純度は、HPLC により 98%以上であることを確認した。

### (3) 薬物の融点測定法

薬物の融点は融点測定器(MP-21, Yamato)により測定した。

### (4) 薬物の分配係数測定法

薬物の見かけの分配係数は、*n*-オクタノール/0.1 M リン酸塩緩衝液(pH 6.8)系及びダイズ油/0.1 M リン酸塩緩衝液(pH 6.8)系で測定した。C10-5'-DFUR の場合、*n*-オクタノールもしくはダイズ油 1g に C10-5'-DFUR (20mg)を溶解し、それぞれの溶液に緩衝液(20ml)を加えた。それぞれの混液を室温にて攪拌して薬物を分配させた後、水層中薬物濃度を HPLC により測定した。5'-DFUR の場合、緩衝液 5ml に 5'-DFUR (50mg)を溶解させ、*n*-オクタノール(40g)もしくはダイズ油(35g)を加えた。薬物を分配させた後、油層から 7g を分取し、分取液より精製水(2ml)で 6 回、薬物を抽出した。その抽出液中薬物濃度を HPLC で測定した。

### (5) 薬物の Lipophilic Index (k')の測定法<sup>6,9)</sup>

アセトニトリル：水系で行った。ノンリテンション物質には、ホルムアミドを用いた。他は本章実験の部(12)と同様の HPLC 条件で行った。

### (6) 薬物の溶解度測定法

C10-5'-DFUR を試験管中の精製水に懸濁させ、その試験管を 37℃で 24 時間保持後、上澄みを分取し、HPLC により測定して溶解度を求めた。ダイズ油への薬物溶解性は、薬物(1~350mg)を、1g のダイズ油に加え、60℃に加温、攪拌後、室温まで冷却し、1 日放置後の液中に薬物固体が析出しているかを目視することで判定した。

(7) *In vitro*におけるエステラーゼによる加水分解試験法<sup>3 6)</sup>

等張リン酸塩緩衝液(pH 7.4)で 1 unit/ml に希釈したエステラーゼ溶液(5ml)を恒温槽で 37℃とし、それに C10-5'-DFUR エタノール溶液( $4 \times 10^{-3}$  M)を 50  $\mu$ l 加えた。経時的にサンプル(100  $\mu$ l)を分取し、等量のアセトニトリルを加えて酵素反応を止めた。サンプル中 C10-5'-DFUR 及び 5'-DFUR 濃度を HPLC により測定した。ジエステル誘導体からモノエステル体への分解速度定数( $k_1$ )は、C10-5'-DFUR 濃度の経時的減少を片対数グラフにプロットし、その傾きから求めた。モノエステル体からの 5'-DFUR の生成速度定数( $k_2$ )は C10-5'-DFUR 及び 5'-DFUR 濃度の経時変化から、非線形最小二乗法により求めた。

(8) LM の調製法<sup>7 0)</sup>

3.15 % (w/v) C10-5'-DFUR, 10 % (w/v)ダイズ油, 1.2 % (w/v) 卵黄レシチン, 2.5 % (w/v) グリセリン, 及び精製水から成る LM 製剤(o/w emulsion)を以下の方法により調製した。C10-5'-DFUR(18.9g)と卵黄レシチン(7.2g)を 80℃で、ダイズ油(60g)に溶解させ、あらかじめ 80℃に暖めたグリセリン水溶液で全量を 600ml とした。その溶液をハイドロシャー(HS-0.5 型, ゴーリン)で 18 分オペレートして粗乳液(粒子径=500  $\mu$ m)を得た。さらに、高圧ホモジナイザー(LAB60-10TBS, ゴーリン)で 21 分オペレートし、LM 製剤(600ml)を得た。その LM 製剤は、室温に冷却後、メンブランフィルター(1.0  $\mu$ m)でろ過し、実験まで 5℃で保存した。

(9) LM 製剤中薬物含有濃度の測定法

LM 製剤(0.5 ml)をアセトニトリル(250 ml) に溶解後、溶液中 C10-5'-DFUR 濃度を HPLC により測定した。

(10) LM の粒子径測定法

LM 製剤を精製水に希釈後、N4 型コールター(日科機)により LM の粒度分布を測定し、重量基準によるメジアン径を求めた。

(11) 動物実験手技

Bollman 等の方法<sup>7 1)</sup>に従い、以下の実験を行った。約 18 時間絶食させた雄性ウ

イスターラット（8週令，体重 190～300g）にペントバルビタール麻酔下(40 mg/kg) 頸動脈カニューレを施し，麻酔覚醒後，薬物を経口投与した．投与後，ボールマンゲージにラットを固定し，経時的にカニューレより血液(500  $\mu$ l)を少量のヘパリン処理したチューブに採取した．サンプルは，直ちに遠心分離して血漿(250  $\mu$ l)を分取し，分析まで凍結した．

リンパ液採取実験の場合，別の胸管リンパにカニューレを施して絶食させたラットに，薬物を経口投与し，カニューレより 24 時間持続的にリンパ液を採取した．

血漿及びリンパ液中 5-FU，5'-DFUR 濃度は，HPLC を用いて測定した．<sup>7,2)</sup> すなわち，サンプル(200  $\mu$ l)に 5-iodouracil 水溶液(250  $\mu$ l)と pH6.0, 1M リン酸塩緩衝液(50  $\mu$ l)を加え，酢酸エチル(8ml)を加えて 10 分攪拌し，遠心分離後，有機層を分取して N<sub>2</sub> ガスで乾固した残査を移動相(250  $\mu$ l)に再溶解し，メンブランフィルター(0.22  $\mu$ m)でろ過後，HPLC に注入した．血漿及びリンパ液中 C10-5'-DFUR 濃度は，サンプル(50  $\mu$ l)に 2 倍量のアセトニトリルを加えて除タンパクした後，上澄みを HPLC に注入して測定した．また，C10-5'-DFUR のモノエステル体の濃度は以下の手順で測定した．すなわち，リンパ液(250  $\mu$ l)に 100 units/ml エステラーゼ溶液(500  $\mu$ l)を加えて 2 時間 37℃でインキュベートして，C10-5'-DFUR と C10-5'-DFUR のモノエステル体を全て 5'-DFUR に変換し，5'-DFUR 濃度を測定して，その薬物濃度と個別に測定した C10-5'-DFUR と 5'-DFUR 濃度の和との差を C10-5'-DFUR のモノエステル体の濃度と考えた．

## (12) HPLC を用いた薬物定量の条件

各薬物に関する HPLC の測定条件を以下に示す．

- ・機種：LC-10A, SPD-10A (島津製作所株)
- ・カラム：YMC-pack-ODS-A (5  $\mu$ m, 6.0×150mm, YMC)
- ・カラム温度：40℃
- ・検出波長：266nm
- ・流速：1.0ml/min
- ・注入量：25  $\mu$ l

Table 21 Mobile Phase for HPLC

Compound	water : methanol
5-FU	95 : 5
5'-DFUR	85 <sup>a)</sup> : 15
C10-5'-DFUR	5 : 95 <sup>b)</sup>

a) 0.05M Acetate buffer (pH4.0). b) Acetonitrile.



## 引用文献

- 1) A. T. Florence, *Pharm. Res.*, **14**, 259-266 (1997).
- 2) 橋田充, “ドラッグデリバリーシステム,” 化学同人, 京都, 1995.
- 3) 塚越茂, 藤田浩, 水島裕, “抗癌剤の効果増強とターゲティング療法,” サイエンスフォーラム, 東京, 1987.
- 4) P. K. Gupta, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 949-962 (1990).
- 5) 鄭主恩, 岡野光夫, *Drug Delivery System*, **15**, 39-48 (2000).
- 6) N. Wakiyama, K. Juni, M. Nakano, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2621-2628 (1982).
- 7) H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa, H. Toguchi, *Pharm. Res.*, **11**, 1143-1147 (1994).
- 8) T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima, *J. Control. Release*, **25**, 89-98 (1993).
- 9) M. Hashida, K. Sato, Y. Takakura, H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3186-3189 (1988).
- 10) S. Benita, “Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery,” Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1998.
- 11) J. E. Chung, M. Yokoyama, T. Okano, *J. Control. Release*, **65**, 93-103 (2000).
- 12) B. Baras, M.-A. Benoit, J. Gillard, *Int. J. Pharmaceut.*, **200**, 133-145 (2000).
- 13) T. Govender, T. Riley, T. Ehtezazi, M. C. Garnett, S. Stolnik, L. Illum, S. S. Davis, *Int. J. Pharmaceut.*, **199**, 95-110 (2000).
- 14) A. M. Tinsley-Bown, R. Fretwell, A. B. Dowsett, S. L. Davis, G. H. Farrar, *J. Control. Release*, **66**, 229-241 (2000).
- 15) K. Juni, M. Nakano, “CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System,” Vol. 3, ed. by S. D. Bruck, CRC Press, Boca Raton, 1987, pp. 209-230.
- 16) R. Bodomeir, J. W. McGinity, *Pharm. Res.*, **4**, 465-471 (1987).
- 17) Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Okada, T. Yashiki, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095-1103 (1988).

- 18) N. H. Shah, A. S. Railker, F. C. Chen, R. Tarantino, S. Kumar, M. Murjani, D. Palmer, M. H. Infeld, A. W. Malick, *J. Control. Release*, **27**, 139-147 (1993).
- 19) H. Natsume, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Pharm. Res.*, **8**, 185-190 (1991).
- 20) 石田理, 丸山一雄, *Drug Delivery System*, **14**, 79-85 (1999).
- 21) 水島裕, 五十嵐理慧, *Drug Delivery System*, **10**, 337-343 (1995).
- 22) R. Wada, S.-H. Hyon, Y. Ikada, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 919-924 (1990).
- 23) A. Suzuki, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, **23**, 599-600 (1996).
- 24) 大河内秀昭, 中野眞汎, *Drug Delievry System*, **11**, 37-42 (1996).
- 25) K. Juni, J. Ogata, M. Nakano, T. Ichihara, K. Mori, M. Akagi, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 313-318 (1985).
- 26) 佐藤一成, 加藤哲朗, 癌と化学療法, **17**, 1105-1110 (1990).
- 27) 竹内洋文, 竹内夕紀子, 日野知証, 山本浩充, 川島嘉明, 中野哲, 山崎太, 熊田卓, 佐々敏, *Drug Delivery System*, **14**, 387-394 (1999).
- 28) Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, S. Fujioka, T. Hino, *J. Control. Release*, **62**, 279-287 (1999).
- 29) K. Juni, M. Nakano, M. Kubota, *J. Control. Release*, **4**, 25-32 (1986).
- 30) R. Bodmeier, K. H. Oh, H. Chen, *Int. J. Pharmaceut.*, **51**, 1-8 (1989).
- 31) D. Bodmer, T. Kissel, E. Traechslin, *J. Control. Release*, **21**, 129-138 (1992).
- 32) Y. Ogawa, H. Okada, M. Yamamoto, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2576-2581 (1988).
- 33) F. Kanzawa, A. Hoshi, K. Kureitani, M. Saneyoshi, T. Kawaguchi, *Cancer Chemother. pharmacol.*, **6**, 19-23 (1981).
- 34) 下山正徳, 最新医学, **28**, 850-857 (1973).
- 35) S. Suzuki, Y. Hongu, H. Fukazawa, S. Ichihara, H. Shimizu, *Gann*, **71**, 238-245 (1980).
- 36) T. Kawaguchi, Doctor thesis, Hoshi University (1985).
- 37) H. Endoh, T. Kawaguchi, T. Seki, T. Hasegawa, K. Juni, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 458-464 (1991).

- 38) T. Kawaguchi, A. Tsugane, K. Higashide, H. Endoh, T. Hasegawa, H. Kanno, T. Seki, K. Juni, S. Fukushima, M. Nakano, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 508-512 (1992).
- 39) L. S. C. Wan, P. W. S. Heng, C. G. H. Chia, *J. Microencapsulation*, **9**, 53-62 (1992).
- 40) C. Witschi, E. Doelker, *J. Control. Release*, **51**, 327-341 (1998).
- 41) M. L. Lorenzo-Lamosa, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, M. J. Alonoso, *J. Control. Release*, **52**, 109-118 (1998).
- 42) S. W. Lee, M. H. Kim, C. K. Kim, *Int. J. Pharmaceut.*, **187**, 193-198 (1999).
- 43) R. H. Marchessault, K. Okamura, C. J. Su, *Macromolecules*, **3**, 735-740 (1970).
- 44) N. D. Miller, D. F. Williams, *Biomaterials*, **8**, 129-137 (1987).
- 45) P. J. Barham, A. Keller, *J. Polym. Sci.*, **24**, 69-77 (1986).
- 46) I. Engelberg, J. Kohn, *Biomaterials*, **12**, 292-304 (1991).
- 47) Y. Nishizawa, J. E. Casida, S. W. Anderson, C. Heidelberger, *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 1605-1619 (1965).
- 48) T. Seki, T. Kawaguchi, H. Endoh, K. Ishikawa, K. Juni, M. Nakano, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 985-987 (1990).
- 49) 関 俊暢, 細田和代, 遠藤浩孝, 川口健夫, 從二和彦, 薬剤学, **52**, 152-159 (1992).
- 50) H. Endoh, Y. Hagita, T. Seki, T. Kawaguchi, K. Juni, *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, **60**, 119-127 (2000).
- 51) H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano, M. Kumakura, T. Mashimo, H. Yuasa, K. Imai, H. Yamanaka, U. Kawaharada, K. Suzuki, *J. Control. Release*, **10**, 293-303 (1989).
- 52) T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 1145-1149 (1963).
- 53) R. W. Baker, H. W. Lonsdale, "Controlled Release of Biological Active Agents," eds by A. C. Tanquary, R. E. Lacey, Plenum, New York, 1974, pp.15-71.
- 54) Y. Aso, S. Yoshioka, A. L. W. Po, T. Terao, *J. Control. Release*, **31**, 33-39 (1994).

- 55) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn*, **4**, 879-885 (1981).
- 56) J. Crank, "The Mathematics of Diffusion," 2nd ed., Oxford University Press, London, 1975, pp.44-68.
- 57) B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, S. W. Kim, *Nature*, **388**, 860-862 (1997).
- 58) 遠藤浩孝, 熊倉克頼, 大森裕正, 奥村睦男, 浮ヶ谷正, 関 俊暢, 從二和彦, *Drug Delivery System*, 受理.
- 59) A. Sakai, N. Mori, S. Shuto, T. Suzuki, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 575-578 (1993).
- 60) T. Kawaguchi, Y. Suzuki, Y. Nakahara, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 301-307 (1985).
- 61) A. B. R. Thomson, J. M. Dietschy, "Physiology of the Gastrointestinal Tract," ed. by L. R. Johson, Raven Press, New York, 1981, pp.1147-1219.
- 62) 武藤泰敏, "消化吸收" 第一出版, 東京, 1990.
- 63) T. Noguchi, W. N. A. Charman, V. J. Stella. *Int. J. Pharmaceut.*, **24**, 173-184 (1985).
- 64) W. N. A. Charman, V. J. Stella. *Int. J. Pharmaceut.*, **33**, 165-172 (1986).
- 65) W. N. A. Charman, V. J. Stella. *Int. J. Pharmaceut.*, **34**, 175-178 (1986).
- 66) M. Aprahamian, C. Michel, W. Humbert, J.-P. Devissaguet, C. Dange, *Biology of the Cell*, **61**, 69-76 (1987).
- 67) P. Jani, G. W. Halbert, J. Langridge, A. T. Florence, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 809-812 (1989).
- 68) N. Ammourey, H. Fessi, J.-P. Devissaguet, M. Dubrasquet, S. Benita, *Pharm. Res.*, **8**, 101-105 (1991).
- 69) T. Yamana, A. Tsuji, E. Miyamoto, O. Kubo, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 747-749 (1977).
- 70) F. Ishii, I. Sasaki, H. Ogata, *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 513-515 (1990).
- 71) J. L. Bollman, J. C. Cava, J. H. Grindley, *J. Lab. Clin. Med.*, **33**, 1349-1352 (1948).
- 72) 町田良治, 中野康之亮, 岩瀬博明, 永井恒司, 薬剤学, **50**, 8-14 (1990).